

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.11.2004

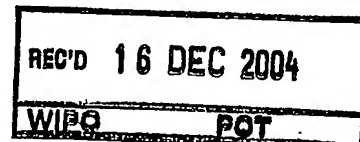
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 8 月 2 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 2 4 6 5 3 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 2 4 6 5 3 3]

出 願 人
Applicant(s): 第一サントリーファーマ株式会社
株式会社第一サントリー生物医学研究所

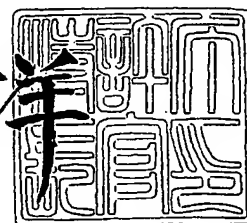


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P7491GNNP
【提出日】 平成16年 8月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 5/10
A61K 48/00
A61P 9/00

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中野区東中野 2 丁目 1 8 番 1 号
【氏名】 安達 三美

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県福岡市東区箱崎 5 丁目 1 1 番地
【氏名】 中山 敬一

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区宮崎 2 丁目 1 3 番地 9 号
【氏名】 北嶋 繁孝

【特許出願人】
【識別番号】 503062312
【氏名又は名称】 第一サントリーファーマ株式会社

【特許出願人】
【識別番号】 500422182
【氏名又は名称】 株式会社第一サントリー生物医学研究所

【代理人】
【識別番号】 100080816
【弁理士】
【氏名又は名称】 加藤 朝道
【電話番号】 045-476-1131

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-391708
【出願日】 平成15年11月21日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 030362
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

(1) サイクリン、
(2) サイクリン依存性キナーゼ、並びに
(3) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、心筋細胞に導入後、当該細胞を培養又は保持することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

【請求項 2】

(1) サイクリン、
(2) サイクリン依存性キナーゼ、並びに
(3) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、生体外で心筋細胞に導入後、当該細胞を培養することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

【請求項 3】

(1) サイクリン、
(2) サイクリン依存性キナーゼ、並びに
(3) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、生体内の心筋細胞に導入後、当該細胞を保持することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

【請求項 4】

サイクリンが、哺乳類のCDK4又はCDK6を活性化し得るサイクリンである請求項1乃至3の何れか1項記載の方法。

【請求項 5】

サイクリンが、哺乳類のサイクリンDである請求項4記載の方法。

【請求項 6】

サイクリン依存性キナーゼが、サイクリンDにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼである請求項1乃至5の何れか1項記載の方法。

【請求項 7】

サイクリン依存性キナーゼが、CDK4又はCDK6である請求項6記載の方法。

【請求項 8】

Cip/Kipファミリー蛋白がp27^{Kip1}である請求項1乃至7の何れか1項記載の方法。

【請求項 9】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子が、Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子である請求項1乃至8の何れか1項記載の方法。

【請求項 10】

Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子が、ユビキチン・リガーゼ構成因子である請求項9記載の方法。

【請求項 11】

ユビキチン・リガーゼ構成因子が、Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子である請求項10記載の方法。

【請求項 12】

Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子が、Skp2である請求項11記載の方法。

【請求項 13】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子に特異的なsiRNAである請求項1乃至12の何れか1項記載の方法。

【請求項 14】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、p27^{Kip1} 遺伝子に特異的なsiRNAである請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

ウイルスベクター又はリポソームを用いて心筋細胞に遺伝子を導入することからなる請求項 1 乃至 14 の何れか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加することからなる請求項 1 乃至 15 の何れか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

(1) サイクリン遺伝子、
(2) サイクリン依存性キナーゼ遺伝子、並びに
(3) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸配列からなる群から選択される 1 つ又はその複数、
を含有するベクター。

【請求項 18】

サイクリンが、哺乳類のCDK4又はCDK6を活性化し得るサイクリンである請求項 17 記載のベクター。

【請求項 19】

サイクリンが、哺乳類のサイクリンDである請求項 18 記載のベクター。

【請求項 20】

サイクリン依存性キナーゼが、サイクリンDにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼである請求項 17 乃至 19 の何れか 1 項記載のベクター。

【請求項 21】

サイクリン依存性キナーゼが、CDK4又はCDK6である請求項 20 記載のベクター。

【請求項 22】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子が、Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子である請求項 17 乃至 21 の何れか 1 項記載のベクター。

【請求項 23】

Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子が、ユビキチン・リガーゼ構成因子である請求項 22 記載のベクター。

【請求項 24】

ユビキチン・リガーゼ構成因子が、Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子である請求項 23 記載のベクター。

【請求項 25】

Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子が、Skp2である請求項 24 記載のベクター。

【請求項 26】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子に特異的なsiRNAである請求項 17 乃至 25 の何れか 1 項記載のベクター。

【請求項 27】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、p27^{Kip1} 遺伝子に対する特異的なsiRNAである請求項 26 記載のベクター。

【請求項 28】

サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加することからなる請求項 17 乃至 27 の何れか 1 項記載のベクター。

【請求項 29】

請求項 1 7 乃至 2 8 の何れか 1 項記載のベクターを含有する医薬組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 乃至 1 6 の何れか 1 項記載の方法により得られた心筋細胞。

【請求項 3 1】

心臓疾患を有する患者の治療方法であって、請求項 2 9 記載の医薬組成物又は請求項 3 0 記載の心筋細胞を、患者の心筋細胞が衰弱又は機能が停止した部位に投与し、当該細胞を保持して増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】心筋細胞の増殖方法

【技術分野】

【0001】

本発明は哺乳動物の心筋細胞を増殖させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

成体における心筋細胞は細胞分裂能を失っているため、虚血や心筋炎等の各種ストレスに曝されることにより心筋細胞が壊死・喪失すると、心筋細胞は補充されることがない。その結果、残存する心筋細胞は代償性に肥大し、心機能を保とうとするが、その状態が持続し、心筋組織の許容範囲を超えてしまうと、さらなる心筋細胞の疲弊、死滅が起こり、最終的には心筋機能の低下、即ち心不全を呈する。

【0003】

心不全をはじめとする心臓疾患は、日本国の死亡原因の第2位となっている。また、心疾患患者の予後はきわめて悪く、5年生存率は50%程度に過ぎない。そのため、有効な心不全治療法の開発は、医療福祉並びに医療経済の観点から、極めて有益であるものと考えられる。これまで心不全治療薬としては、心筋の収縮力を増加させるジギタリス製剤やキサンチン製剤等の強心剤が使用されてきたが、これらの薬剤を長期投与すると、むしろ病態を悪化させる場合もあることが知られている。また、最近では、 β 遮断薬やACE阻害薬等、交感神経系やレニン-アンジオテンシン系の亢進による過剰な心臓負荷を軽減する薬剤による治療が主流になってきているが、これらは対症的治療法に過ぎず、傷害を受けた心組織そのものを回復させるものではない。一方、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足や医療倫理、患者の肉体的・経済的負担の重さ等の問題から、一般的な治療法として本法を用いることは難しい。

【0004】

最近では、傷害心組織に対し、心筋細胞を補充的に移植する方法も検討されている。動物を用いた実験では、胎児から回収した心筋細胞を成体心組織に移植すると、移植細胞は心筋細胞として有効に機能することが知られている（例えば、非特許文献1参照）。また、胚性幹細胞（ES細胞）と呼ばれる、心筋細胞を含む多種多様な細胞に分化する能力を持った多能性細胞から心筋細胞を作製し、それを移植用細胞として用いる研究も進められている。しかしながら、これらの方法は、倫理的観点から臨床医療への応用は難しい面がある。又、最近では、骨髄由来幹細胞を移植し、当該幹細胞を心組織内で心筋細胞に分化させる試みもなされているが、その分化効率はきわめて低く、心筋細胞を再生・補充する方法としては実用的ではないのが現状である（以上、総説として、例えば、非特許文献2，3，4等参照）。

【0005】

そこで、本発明の発明者らは、心筋細胞の細胞周期調節機構、特にサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ（CDK）システムの役割について研究を行なった結果、心筋細胞では、血清や増殖因子等の増殖刺激によってD型サイクリン並びにCDK4の発現誘導は起こるものの、これらの蛋白分子は細胞質に局限し核内へ移行せず、その結果、サイクリンD-CDK4の核内標的分子であるRB蛋白のリン酸化及びサイクリンE-CDK2の活性化が起こらないことを見い出した。さらに、サイクリンD1に核移行シグナル（nucleus localizing signal：NLS）を付加した遺伝子（以下、D1NLS）と、CDK4をコードする遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し、培養心筋細胞に感染させたところ、サイクリンD1蛋白並びにCDK4蛋白が核内に発現し、RBのリン酸化を介して心筋細胞の増殖、分裂を起こすことを明らかにした。その結果、通常の培養条件下ではほとんど増殖（有糸分裂）をしない心筋細胞を増殖させることに成功した。また、D1NLS及びCDK4遺伝子を成獣の心筋組織に導入・発現させることにより、成獣の心筋細胞の細胞周期を進行させることにも成功した（例えば、特許文献1、非特許文献5参照）。以下、当該発明により心筋細胞を増殖させる方法をDNLS/CDK法と称する。また、上記の特許文献1及び非特許文献5とそれらの中に記載

されている他の文献すべての開示内容は、本出願明細書にも含まれるものとする。

【0006】

心筋細胞の細胞周期を進行させ、その細胞分裂を誘導しようという試みは他にも数多く行われてきた（以下、心筋細胞の細胞周期進行に関する総説として、例えば、非特許文献6参照）。例えば、ラット新生仔から回収した培養心筋細胞に、アデノウイルス由来のE1A/E1B遺伝子（非特許文献7）又はE2F遺伝子（非特許文献8参照）を発現させると、心筋細胞のDNA合成の誘導が起こることが報告されている。また、核移行シグナルをもたない通常型のサイクリンD1遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、心筋細胞においてCDK4の発現レベルの上昇と共にDNA合成の誘導も認められる（例えば、非特許文献9参照）。更に最近では、サイクリンD1遺伝子の発現を抑制するjumonji遺伝子の欠失マウスでは、胎児心筋細胞における細胞増殖停止時期の延長がみられることも示されている（例えば、非特許文献10参照）。この様に、心筋細胞においてもDNA合成の誘導並びに細胞周期の進行が可能であることが示されているが、上記の実験例では心筋細胞においてアポトーシスの誘導や、異常な多核細胞の出現がみられていることが多く、出生後の心筋細胞の細胞分裂を促し、実際に細胞数を増加させる方法は、DNLS/CDK法以外には皆無である。

【0007】

この様にDNLS/CDK法は、通常は「増えない」心筋細胞を増やすことができる画期的な方法であり、産業上の利用価値も高い。

【0008】

一般の真核細胞において、複数の正及び負の調節因子が細胞周期の進行を調節していることが知られている。正の調節因子は前出のサイクリン及びCDKの各種が挙げられ、一方、負の調節因子としては、CDK阻害因子と称される一連の蛋白質群が挙げられ、作用様式の異なる2つのCDK阻害因子ファミリーが同定されている（総説として例えば、非特許文献11参照）。1つめのグループは、Ink4ファミリー蛋白と呼ばれており、p16（Ink4A、Mts1、Cdkn2及びCdkn4iとしても知られている）、p15（Ink4B及びMts2としても知られている）、p18（Ink4C及びInk6Aとしても知られている）並びにp19（p20、Ink4D及びInk6Bとしても知られている）を含み、CDK4又はCDK6と選択的に結合してサイクリンD-CDK4（又はCDK6）複合体の機能を阻害する（例えば、非特許文献12, 13, 14参照）。CDK阻害蛋白の2つ目のグループは、Cip/Kipファミリー蛋白と呼ばれており、p21（Cip1、Pc1、Sdi1、mda6及びWaf1としても知られている；以下、p21^{Cip1}）、p27（Ick、Kip1及びPic2としても知られている；以下、p27^{Kip1}）、並びにp57（Kip2としても知られている；以下、p57^{Kip2}）を含んでおり、Ink4ファミリーと異なり、種々のサイクリン-CDK複合体の機能を阻害することにより、細胞周期の進行を阻害することが明らかにされている（例えば、非特許文献15, 16, 17, 18参照）。

【0009】

心筋細胞の増殖抑制において、これらCDK阻害蛋白がどの様に関与しているのかについては、Cip/Kipファミリー蛋白に関して、いくつかの報告がある。即ち、胎生後期から生後にかけて、心筋細胞の増殖能が低下するのに伴い、p21^{Cip1}蛋白やp27^{Kip1}蛋白の発現量が高まり、当該蛋白の標的分子であるCDK2やCDK4の活性化が低下することが知られている（例えば、非特許文献19参照）。又、E2F-1遺伝子を過剰発現させた心筋細胞にIGF-1（insulin-like growth factor-1）を添加すると、p21^{Cip1}蛋白やp27^{Kip1}蛋白の発現量が減少し、それに伴いDNA合成期（S期）の心筋細胞の割合が増加する（例えば、非特許文献20参照）。更に、p27^{Kip1}遺伝子欠損マウスでは、通常のマウスよりも心筋細胞の増殖停止の時期に遅れがみられ、心筋細胞の数が増えることが報告されている（例えば、非特許文献21参照）。この様にCip/Kipファミリー蛋白、特にp27^{Kip1}が心筋細胞の増殖抑制に関与している可能性が示唆されていたが、上記の遺伝子を欠損させる方法以外には、Cip/Kipファミリー蛋白の発現・作用を抑制し、それによって心筋細胞を分裂・増殖させた例は皆無である。

【0010】

Cip/Kipファミリー蛋白の細胞内における発現レベルは、主としてユビキチン経路を介した分解系によって調節されていることが知られている（例えば、非特許文献22, 23, 24参照）。ユビキチンは、進化上、高度に保存された76個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、全ての真核細胞中に豊富に存在する。ユビキチン経路では、ポリユビキチン鎖が標的基質へ共有結合した後、多機能性プロテアソーム複合体によって分解される。この様なユビキチン-プロテアソーム系により分解を受ける蛋白分子は、Cip/Kipファミリー蛋白の他にもサイクリン、p53、p300、E2F、STAT-1、c-Myc、c-Jun、EGF受容体、I κ B α 、NF κ B及び β -カテニン等、多岐にわたる。蛋白分子のユビキチン化機構に関しては精力的な研究が進められており、一般に、一連の酵素群、即ち、ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン複合化酵素（E2）及びユビキチン・リガーゼ（E3）の働きによってユビキチン修飾を受けた蛋白分子が、最終的に26Sプロテアソームにより分解される（以上、総説として、例えば、非特許文献25, 26, 27, 28等参照）。

【0011】

このうち、特定の標的蛋白をユビキチン化するための特異性に関与しているのはユビキチン・リガーゼ（E3）であると考えられており、Anaphase Promoting Complex/Cyclosome（APC/C）複合体やVHL（von Hippel-Lindau protein-elongin B/C（VBC）複合体、Nedd4、Ufd4、Rad5、Rad18、Parkin等、数多くの例が知られている。近年、酵母等の下等生物における研究を通じて、SCFと称される複合体から構成される新しいタイプのユビキチン・リガーゼが同定されている。このSCF複合体タイプのユビキチン・リガーゼ（以下、ユビキチン・リガーゼSCF複合体と記すことがある）は、Skp1、Cul1（別名、Cdc53）、及びF-ボックス（F-box）蛋白と称される3つのサブユニットから構成される3量体の蛋白質モジュールであり、各サブユニットの頭文字をとってSCFと称されている（総説として、例えば、非特許文献29, 30参照等）。

【0012】

SCF複合体の構成因子の1つであるF-ボックス蛋白は、サイクリンFで最初に同定されたF-ボックス・モチーフを含み、このモチーフ領域はSkp1との相互作用に必要である。また、F-ボックス蛋白は、他にもWD-40リピートと呼ばれる40個程度のアミノ酸配列の繰り返しモチーフ領域又はロイシンに富んだロイシン・リッチ・リピート（leucine-rich repeat）と呼ばれるモチーフ領域を有している。SCF複合体において、Skp1及びCul1/Cdc53はどのような標的基質に対しても一定であるが、F-ボックス蛋白はユビキチン化の対象となる標的基質に応じてその分子種が異なっており、WD-40リピート又はロイシン・リッチ・リピートにおいて標的基質を認識・結合することにより、SCF複合体の基質特異性を決定している（例えば、非特許文献31, 32, 33参照）。この様に、SCF複合体には、構成因子として含むF-ボックス蛋白の違いにより、SCF ^{β TrCP}、SCF^{Cdc4}、SCF^{Met30}、SCF^{Grr1}等の複数の種類が存在している（例えば、非特許文献29, 30参照）。

【0013】

Cip/Kipファミリー蛋白の場合、そのユビキチン-プロテアソーム分解には、F-ボックス蛋白としてSkp2を含むSCF複合体（SCF^{Skp2}）が関与していることが知られている（例えば、非特許文献34, 35, 36, 37参照）。Skp2は当初、サイクリンA-CDK2複合体に結合する因子として同定され、一般的な増殖細胞では、細胞周期のG1後期から蓄積が起こり、その発現量はS期（DNA合成期）からG2期にかけて最大となるため、S期キナーゼ会合タンパク質（S-phase kinase-associated protein）と呼ばれている（例えば、非特許文献38参照）。また、Skp2はCip/Kipファミリー蛋白以外に、E2F-1（非特許文献39参照）やサイクリンE（非特許文献40参照）、CDK9（非特許文献41参照）、c-Myc（非特許文献42, 43参照）等の蛋白分子も標的基質として認識し、その分解に携わっていることが報告されている。

【0014】

この様に、Cip/Kipファミリー蛋白をはじめとするCDK阻害因子が一般的な増殖性細胞の増殖抑制に関与しており、その細胞内発現量の制御は、SCF^{Skp2}複合体を介したユビキチン-プロテアソーム系が担っていることが知られている。しかし、心筋細胞の増殖制御機

構において、ユビキチン-プロテアソーム系がどのような関与をしているのかについてはほとんど知られていない。

【0015】

上述のDNLS/CDK法は現在唯一知られている心筋細胞の増殖方法であり、非常に有用で産業上の利用価値も高い。しかしながら、更なる心筋再生治療の実用化及び産業化の可能性を増すために、より一層、心筋細胞の増殖効果及び効率を高めることが望まれている。

【0016】

【特許文献1】 国際公開第02/095026号パンフレット

【非特許文献1】 Soonpaaら、Science 264:98, (1994)

【非特許文献2】 Murryら、Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 67:519, (2002)

【非特許文献3】 Menasche、Ann. Thorac. Surg. 75:S20, (2003)

【非特許文献4】 Nirら、Cardiovasc. Res. 58:313, (2003)

【非特許文献5】 Tamamori-Adachiら、Circ. Res. 92:e12, (2003)

【非特許文献6】 Kishoreら、Circ. Res. 90:1044, (2002)

【非特許文献7】 Kirshenbaumら、J. Biol. Chem. 270:7791, (1995)

【非特許文献8】 Kirshenbaumら、Dev. Biol. 179:402, (1996)

【非特許文献9】 Soonpaaら、Clin. Invest. 99:2644, (1997)

【非特許文献10】 Toyodaら、Dev. Cell 5:85, (2003)

【非特許文献11】 Sherr & Roberts、Genes Dev. 9:1149, (1995)

【非特許文献12】 Hannon & Beach、Nature 371:257, (1993)

【非特許文献13】 Serranoら、Nature 366:704, (1993)

【非特許文献14】 Hiraiら、Mol. Cell. Biol. 15:2672, (1995)

【非特許文献15】 Harperら、Cell 75:805, (1993)

【非特許文献16】 Polyakら、Cell 78:59, (1994)

【非特許文献17】 Toyoshima & Hunter Cell 78:67, (1994)

【非特許文献18】 Matsuokaら、Genes Dev. 9:650, (1995)

【非特許文献19】 Flinkら、J. Mol. Cell. Cardiol. 30:563, (1998)

【非特許文献20】 von Harsdorfら、Circ. Res. 85:128, (1999)

【非特許文献21】 Poolmanら、Circ. Res. 85:117, (1999)

【非特許文献22】 Paganoら、Science 269:682, (1995)

【非特許文献23】 Maki & Howley、Mol. Cell Biol. 17:355, (1997)

【非特許文献24】 Uranoら、J. Biol. Chem. 274:12197, (1999)

【非特許文献25】 Couxら、Annu. Rev. Biochem. 65:801, (1996)

【非特許文献26】 Hochstrasser、Annu. Rev. Genet. 30:405, (1996)

【非特許文献27】 Pagano、FASEB J. 11:1067, (1997)

【非特許文献28】 Hershkoら、Annu. Rev. Biochem. 67:425, (1998)

【非特許文献29】 Pattonら、Trends Genet. 14:236, (1998)

【非特許文献30】 Jackson & Eldridge、Mol. Cell 9:923, (2002)

【非特許文献31】 Baiら、Cell 86:263, (1996)

【非特許文献32】 Skowryaら、Cell 91:209, (1997)

【非特許文献33】 Kobeら、Curr. Opin. Struct. Biol. 11:725, (2001)

【非特許文献34】 Carranoら、Nature Cell Biol. 1:193, (1999)

【非特許文献35】 Tsvetkovら、Curr. Biol. 9:661, (1999)

【非特許文献36】 Bornsteinら、J. Biol. Chem. 278:26752, (2003)

【非特許文献37】 Kamuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10231, (2003)

【非特許文献38】 Zhangら、Cell 82:915, (1995)

【非特許文献39】 Martiら、Nat. Cell Biol. 1:14, (1999)

【非特許文献40】 Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, (2000)

【非特許文献41】 Kiernanら、Mol. Cell. Biol. 21:7956, (2001)

【非特許文献42】 Kimら、Mol. Cell 11:1177, (2003)

【非特許文献 43】 von der Lehrら、Mol. Cell 11:1189, (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、心筋細胞の増殖方法において増殖効率をより高める方法や当該方法に用いる組換えベクター等の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

上記課題を解決するために、発明者らは、心筋細胞における細胞周期調節機構に関する解析を行った。即ち、サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 遺伝子を強制発現させた心筋細胞における、各種細胞周期調節因子、特にCDK阻害因子の挙動に着目して検討を行った結果、サイクリン及びCDK刺激下の心筋細胞の核内には、CDK阻害因子であるCip/Kipファミリー蛋白の1種、 $p27^{Kip1}$ が予期せぬ程、過剰に蓄積していることを見出した。

【0019】

一般的な増殖性細胞において、 $p27^{Kip1}$ をはじめとするCip/Kipファミリー蛋白は、ユビキチン・リガーゼによりユビキチン化され、プロテアソームによる分解をうけることが知られている。そこで、ユビキチン・リガーゼの構成分子の1つをコードする遺伝子を、サイクリン及びCDK遺伝子と一緒に心筋細胞で共発現させたところ、心筋細胞核内における $p27^{Kip1}$ 蛋白の著しい減少が認められた。更に当該心筋細胞では、著しくその細胞増殖性が亢進することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0020】

即ち、本発明は、サイクリン及びCDK刺激により心筋細胞の細胞内で発現するCip/Kipファミリー蛋白の産生や機能、働き(作用)を阻害することにより、当該細胞の増殖の効率を高めることを特徴とする方法に関する。その作用を抑制すべきCip/Kipファミリー蛋白は、特にこれを限定しないが、好ましくは $p27^{Kip1}$ である。

【0021】

本発明において、心筋細胞とは、一般的な心筋細胞の形態学的、生理学的及び/又は免疫学的特徴として認識される、心筋細胞に特異的な複数のマーカーを発現していればよく、哺乳動物の心組織から直接回収した心筋細胞及びその初代培養細胞のみならず、胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞、CMG細胞等の幹細胞から分化誘導した心筋細胞でも良い。

【0022】

Cip/Kipファミリー蛋白の産生や機能、働きを阻害する方法としては、特にこれを限定しないが、当該蛋白をコードする遺伝子の発現抑制、当該蛋白の産生抑制、当該蛋白の活性阻害、又は当該蛋白の分解促進であること等が挙げられる。

【0023】

特に、当該蛋白の分解を促進する方法としては、当該蛋白のユビキチン化を促す方法が望ましく、当該ユビキチン化は、ユビキチン化を促す薬剤、蛋白、ペプチド、低分子化合物、遺伝子等を、目的とする分化細胞に導入することにより達成できる。

【0024】

また、Cip/Kipファミリー蛋白のユビキチン化を促す遺伝子としては、好ましくはユビキチン・リガーゼ構成因子をコードする遺伝子が挙げられ、より好ましくはCip/Kipファミリー蛋白と結合し得るF-ボックス因子をコードする遺伝子を挙げることができ、特に好ましくは、例えばSkp2遺伝子を挙げることができる。

【0025】

また、本発明の実施において、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子の発現(mRNAの転写)や当該遺伝子産物の翻訳・産生を阻害する方法も利用出来る。例えば、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子に対する特異的なsiRNA等の使用が好適である。

【0026】

更に本発明の実施において、サイクリン遺伝子及びCDK遺伝子の少なくとも一方に核移

行シグナルをコードする塩基配列を付加して、上記分化細胞に導入することが好ましい。上記サイクリンはCDK4又はCDK6を活性化することができるサイクリンであり、例えば哺乳類のサイクリンD1、D2及びD3等が好適である。また、上記CDKはD型サイクリンにより活性化されるものであり、例えば哺乳類のCDK4及びCDK6が好適である。

【0027】

別の実施態様において、本発明は、上記のサイクリン遺伝子、CDK遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の作用を阻害する因子の遺伝子を含有するベクターに関する。心筋細胞に当該遺伝子を導入する場合は、ウイルス性ベクター又はリポソーム等を用いて行うことが好ましく、例えばウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクターを用いることが好ましい。

【0028】

別の実施態様において、本発明は、上記のサイクリン遺伝子、CDK遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の作用を阻害する因子の遺伝子を含むベクターを含有する医薬組成物に関する。

【0029】

別の実施態様において、本発明は、上記の心筋細胞の増殖方法により得られた心筋細胞に関する。

【0030】

別の実施態様において、本発明は、心筋細胞等の生存・機能を維持・促進する新規因子又は可能性ある化学療法剤を同定するために、上記心筋細胞の増殖方法により得られた細胞を用いたスクリーニング方法に関する。

【0031】

別の実施態様において、本発明は、当該医薬組成物又は当該心筋細胞を患者の心筋細胞が衰弱又は機能が停止した部位に投与（移植）し、当該細胞を保持して増殖させることとなる心臓疾患の治療方法に関する。

【0032】

即ち、本願発明は主に以下の事項に関する。

(1) (a) サイクリン、(b) サイクリン依存性キナーゼ、並びに (c) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、心筋細胞に導入後、当該細胞を培養又は保持することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

(2) (a) サイクリン、(b) サイクリン依存性キナーゼ、並びに (c) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、生体外で心筋細胞に導入後、当該細胞を培養することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

(3) (a) サイクリン、(b) サイクリン依存性キナーゼ n 並びに (c) Cip/Kipファミリー蛋白の産生、機能又は働きを阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸からなる群から選択される1つ又はその複数を、生体内の心筋細胞に導入後、当該細胞を保持することを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

(4) サイクリンが、哺乳類のCDK4又はCDK6を活性化し得るサイクリンである上記 (1) 乃至 (3) 記載の方法。

(5) サイクリンが、哺乳類のサイクリンDである上記 (4) 記載の方法。

(6) サイクリン依存性キナーゼが、サイクリンDにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼである上記 (1) 乃至 (5) 記載の方法。

(7) サイクリン依存性キナーゼが、CDK4又はCDK6である上記 (6) 記載の方法。

(8) Cip/Kipファミリー蛋白がp27^{Kip1}である(1)乃至(7)記載の方法。

(9) Cip/Kipファミリー蛋白の作用を阻害する因子が、Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子である上記 (1) 乃至 (8) 記載の方法。

(10) Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子が、ユビキチン・リガーゼ構成因子である上記 (9) 記載の方法。

- (11) ユビキチン・リガーゼ構成因子が、Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子である上記(10)記載の方法。
- (12) Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子が、Skp2である上記(11)記載の方法。
- (13) Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸又はその誘導体が、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子に特異的なsiRNA又はその誘導体である(1)乃至(12)に記載の方法。
- (14) Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸又はその誘導体が、p27^{Kip1}遺伝子に特異的なsiRNA又はその誘導体である(13)記載の方法。
- (15) ウイルスベクター又はリポソームを用いて心筋細胞に遺伝子を導入することからなる(1)乃至(14)記載の方法。
- (16) サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加することからなる上記(1)乃至(15)の何れかに記載の方法。
- (17) (a) サイクリン遺伝子、(b) サイクリン依存性キナーゼ遺伝子、並びに(c) Cip/Kip蛋白の作用を阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸配列からなる群から選択される1つ又は複数、を含有するベクター。
- (18) サイクリンが、哺乳類のCDK4又はCDK6を活性化し得るサイクリンである上記(17)記載のベクター。
- (19) サイクリンが、哺乳類のサイクリンDである上記(18)記載のベクター。
- (20) サイクリン依存性キナーゼが、サイクリンDにより活性化されるサイクリン依存性キナーゼである上記(17)乃至(19)の何れか記載のベクター。
- (21) サイクリン依存性キナーゼが、CDK4又はCDK6である上記(20)記載のベクター。
- (22) Cip/Kipファミリー蛋白の作用を阻害する因子が、Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子である上記(17)乃至(21)の何れか記載のベクター。
- (23) Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す作用を有する因子が、ユビキチン・リガーゼ構成因子である上記(22)記載のベクター。
- (24) ユビキチン・リガーゼ構成因子が、Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子である上記(23)記載のベクター。
- (25) Cip/Kipファミリー蛋白に結合し得るF-ボックス因子が、Skp2である上記(24)のベクター。
- (26) Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子に特異的なsiRNAである(17)乃至(25)の何れか記載のベクター。
- (27) Cip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸が、p27^{Kip1}遺伝子に対する特異的なsiRNAである(26)記載のベクター。
- (28) サイクリン遺伝子及びサイクリン依存性キナーゼ遺伝子の少なくとも一方に核移行シグナルをコードする塩基配列を付加することからなる上記(17)乃至(27)の何れかに記載のベクター。
- (29) 上記(17)乃至(28)の何れかに記載のベクターを含有する医薬組成物。
- (30) 上記(1)乃至(16)の何れかに記載の方法により得られた心筋細胞。
- (31) 心臓疾患を有する患者の治療方法であって、上記(29)記載の医薬組成物又は上記(30)記載の心筋細胞を、患者の心筋細胞が衰弱又は機能が停止した部位に投与し、当該細胞を保持して増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法。

【発明の効果】**【0033】**

本発明の方法を用いることにより、心筋細胞の核内におけるCip/Kipファミリー蛋白の作用を阻害して心筋細胞の増殖を促進することができる。更に、本発明に係る利点や特徴は、以下の好適な実施態様の詳細な説明において十分に記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本発明の実施において、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNA技術等の一般的方法及び従来技術について、実施者は、特に示されなければ、当該分野の標準的な参考書籍を参照し得る。これらには、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版 (Sambrook & Russell、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001) ; Current Protocols in Molecular biology (Ausubelら編、John Wiley & Sons、1987) ; Methods in Enzymologyシリーズ (Academic Press) ; PCR Protocols: Methods in Molecular Biology (Bartlett & Striling編、Humana Press、2003) ; Animal Cell Culture: A Practical Approach 第3版 (Masters編、Oxford University Press、2000) ; Antibodies: A Laboratory Manual (Harlowら & Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1987) を参照のこと。また、本明細書において参照される細胞培養、細胞生物学実験のための試薬及びキット類はSigma社やAldrich社、Invitrogen/GIBCO社、Clontech社、Stratagene社等の市販業者から入手可能である。

【0035】

(心筋細胞の調製)

本発明に係る方法を用いて増殖させる対象とする心筋細胞は、胎児型心筋細胞、幼体型心筋細胞、並びに成体型心筋細胞のすべての発生段階の細胞を含み、以下に記載する少なくとも1つ、好ましくは複数の方法により、少なくとも1つ、好ましくは複数のマーカーや基準が確認できる細胞と定義される。

【0036】

心筋細胞に特異的な種々のマーカーの発現は、従来の生化学的又は免疫化学的手法により検出される。その方法は特に限定されないが、好ましくは、免疫組織化学的染色法や免疫電気泳動法の様な、免疫化学的手法が使用される。これらの方法では、心筋前駆細胞又は心筋細胞に結合する、マーカー特異的ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を使用することができる。個々の特異的マーカーを標的とする抗体は市販されており、容易に使用することができる。心筋前駆細胞又は心筋細胞に特異的なマーカーは、例えば、ミオシン重鎖/軽鎖や α -アクチニン、トロポニンI、ANP、GATA-4、Nkx2.5、MEF-2c等が挙げられる。

【0037】

あるいは、心筋前駆細胞又は心筋細胞特異的マーカーの発現は、特にその手法は問わないが、逆転写酵素介在性ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)やハイブリダイゼーション解析といった、任意のマーカー蛋白質をコードするmRNAを増幅、検出、解析するための従来から頻用される分子生物学的方法により確認できる。心筋前駆細胞又は心筋細胞に特異的なマーカー(例えば、ミオシン重鎖/軽鎖や α -アクチニン、トロポニンI、ANP、GATA-4、Nkx2.5、MEF-2c)蛋白質をコードする核酸配列は既知であり、National Center for Biotechnology informationのジェンバンク(GenBank)の様な公共データベースにおいて利用可能であり、プライマー又はプローブとして使用するために必要とされるマーカー特異的配列を容易に決定することができる。

【0038】

更に、生理学的基準も追加的に使用される。即ち、心筋細胞が、自立的拍動性を有することや、各種イオンチャンネルを発現しており電気生理的刺激に反応し得ること等も、その有用な指標となる。

【0039】

本発明で開示される方法は、哺乳動物の心臓組織内に存在する心筋細胞を直接の対象とすることができるが、生体心臓組織から酵素処理等の種々の方法により分離した心筋細胞、又はそれを適当な培養条件下で1~5日間程度培養した初代培養細胞も用いることができる。具体的な心筋細胞の培養法は数多くの参考文献に記載されているが、ここではその代表的な方法として、Chienの方法及びその変法(Chienら、J. Clin. Invest. 75:1770, 1985; Meidellら、Am. J. Physiol. 251:H1076, 1986; Tamamoriら、Am. J. Physiol. 275: H2036, 1998)を挙げる。

【0040】

また、培養心筋細胞としては、上記の例に限らず、幹細胞から分化誘導して得られた心筋細胞も含まれる。本発明の実施に用いられる幹細胞とは、試験管内培養下で心筋細胞様形質を有する細胞に分化し得る性質を有した細胞を意味し、具体的には、既に培養細胞として広く使用されているマウス、サル、ヒト等の哺乳動物由来の胚性幹細胞（ES細胞）や胚性生殖細胞（EG細胞）、成人型多能性幹細胞（MAPC）等の多能性幹細胞を挙げることができる。これらの細胞の作製、継代、保存法については、すでに標準的なプロトコールが確立されており、実施者は、複数の参考書籍、例えば、Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual (Hoganら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994) や、Embryonic Stem Cells (Turksen編、Humana Press, 2002)、及び複数の参考文献 (Matsuiら、Cell 70:841, 1992; Shambloottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998; 米国特許第6,090,622号; Jiangら、Nature 418:41, 2002; 国際公開第01/11011号) を参照することにより、これらの多能性幹細胞を容易に使用し得る。

【0041】

また、本発明に用いることができる幹細胞は、上記の3種に限らず、ES細胞と類似の形質を有する幹細胞であれば使用可能である。この場合、ES細胞と類似の形質とは、ES細胞に特異的な表面（抗原）マーカーの存在やES細胞特異的な遺伝子の発現、さらにはテラトーマ（teratoma）形成能やキメラマウス形成能といった、ES細胞に特異的な細胞生物学的性質をもって定義することができ、具体例としては、毛根鞘細胞や表皮細胞を5-アザシチジン等の薬剤で処理して得られた幹細胞 (Sharda & Zahner、国際公開第02/051980号) や、単核球細胞をCR3/43抗体で処理して得られた幹細胞 (Abuljadayel、Curr. Med. Res. Opinion 19:355, 2003)、さらには成体内耳細胞に由来する幹細胞 (Liら、Nature Med., Advance online publication) 等のES細胞と類似の形質を有する幹細胞が挙げられる。

【0042】

また、ES細胞と類似の形質を有さない細胞、又は多能性幹細胞ではない細胞であっても、少なくとも試験管内培養下で心筋細胞様形質を有する細胞に分化し得る性質を有した細胞であれば、本発明に記載の方法を用いることができる。この様な細胞の例として、骨髓細胞に由来する骨髓間葉系幹細胞 (Bruderら、米国特許第5,736,396号; Pittengerら、Science 284:143, 1999) やCMG細胞 (Makinoら、J. Clin. Invest. 103:697, 1999; 国際公開第01/048151号)、筋組織に由来するSpoc細胞 (国際公開第03/035382号) が挙げられる。

【0043】

本発明において、幹細胞から心筋細胞を作製する培養法としては、心筋細胞の分化誘導に適した方法であれば、いずれも用いることができる。例えばES細胞を用いる場合、浮遊培養法、懸滴（hanging drop）培養法、支持細胞との共培養法、旋回培養法、軟寒天培養法、マイクロキャリア培養法等を挙げることができる。具体的な分化誘導法については、既に複数の方法が確立されており、実施者は、例えば、Embryonic Stem Cells (Turksen編、Humana Press, 2002) の様な参考書籍や、複数の参考文献 (Klugら、J. Clin. Invest. 98:216, 1996; Wobusら、J. Mol. Cell. Cardiol. 29:1525, 1997; Kehatら、J. Clin. Invest. 108:407, 2001; Chunhuiら、Circ. Res. 91:508, 2002; Takahashiら、Circulation 107:1912, 2003; Fieldら、米国特許第6,015,671号; Chunhuiら、国際公開第03/06950号) を参照することができる。

【0044】

（心筋細胞を増殖させる方法）

本発明の実施態様の1つは、サイクリン及びCDKを心筋細胞に導入及び発現させること、並びにCip/Kip蛋白の産生や機能、働きを阻害することを特徴とする心筋細胞の増殖法である。心筋細胞としては、上記の通り、生体心組織から酵素処理等の種々の方法により分離した心筋細胞、又はそれを適当な培養条件下で1～5日間程度培養した初代培養細胞、及び各種幹細胞から分化誘導した心筋細胞を用いることができるが、哺乳動物の心臓組織内に存在する心筋細胞に直接、後述する種々の方法による処理を施し、当該細胞を生体

内で保持することによっても増殖させることができる。ここで、本発明において「保持する」とは、適度な体温や必要量の血流等の生理的な体内環境において、当該細胞を生理的な機能を損なうことなく生存させ、細胞を維持することを意味する。

【0045】

サイクリン及びCDKを心筋細胞に導入及び／又は発現させるための、最も好適な方法の1つとして、発明者らが以前に報告したDNLS/CDK法（前掲の特許文献1及び非特許文献5参照）を挙げることができる。即ち、サイクリンD1にNLSを付加したD1NLS遺伝子又はCDK4遺伝子を組み込んだ2種のアデノウイルスベクターを作製し、心筋細胞に両ウイルスを感染させることにより、サイクリンD1蛋白並びにCDK4蛋白が核内に局在し、その結果、通常、ほとんど分裂・増殖をしない心筋細胞の分裂・増殖を促すことができる。なお、上記の特許明細書及び論文に記載されている内容は、本出願明細書にも含まれるものとする。

【0046】

本発明の実施において、サイクリン及びCDKを心筋細胞に導入及び／又は発現させる方法は、上記DNLS/CDK法と同様の効果を導き得る方法であれば、特にこれを限定しない。例えば、心筋細胞に導入し、発現させるサイクリンとしては、CDK4又はCDK6を活性化できるものであれば良く、サイクリンD1以外にも、サイクリンD2又はサイクリンD3遺伝子を使用することもできる。

【0047】

一方、CDKとしては、D型サイクリンによって活性化されるものであれば良く、CDK4のみならずCDK6を用いても良い。これらのサイクリン又はCDK遺伝子は、既にヒトを初め種々の生物から単離・同定され、その塩基配列がジェンバンク等の公共のDNAデータベースにおいて利用可能であるため、当業者であれば、特異的なプライマー又はプローブを設計し、一般的な分子生物学的手法を用いることにより、所望の遺伝子を取得することは容易である。

【0048】

サイクリン及びCDKを心筋細胞に導入する方法としては、顕微注入等の物理的な方法も可能であるが、導入効率の観点から遺伝子導入法を用いることが好ましい。又、導入した遺伝子の発現により心筋細胞の細胞質内で合成された蛋白分子を、核内に移行させることが望ましい。そのための方法としては、特にこれを限定しないが、上記各遺伝子にNLSをコードする塩基配列を付加する方法を挙げることができる。これらの遺伝子により産生された2種の蛋白、即ちサイクリン及びCDKは細胞質内で複合体を形成するため、何れか一方、好ましくはサイクリン遺伝子がNLS配列を有すれば、当該複合体が核内に移行することができる。現在、NLS配列として知られるものには3種類が知られている。即ち、第一の例は、リジンやアルギニン等の塩基性のアミノ酸をほとんどもたないタイプであり、例えばインフルエンザウイルスの核蛋白（nucleoprotein）のNLSである（Davyら、Cell 40:667, 1985）。第二の例は、塩基性アミノ酸を多く含むタイプであり、例えばSV40 T抗原のNLS配列（N-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-C；配列番号1）が挙げられる（Kalderonら、Nature 311:33, 1984）。第三の例は、塩基性アミノ酸が約10アミノ酸を隔ててクラスターを作っているタイプで、BipartiteタイプのNLSと呼ばれるものである（Robbinsら、Cell 64:615, 1991）。本発明の実施において用いるNLSは上記3種のどれでも良く、上記3種以外のNLSも使用できるが、NLS配列の長さ、所望する蛋白分子を核移行させる能力、およびNLS配列遺伝子の入手・利用の容易性等の観点から、SV40 T抗原のNLS配列の使用が好適である。例えば、SV40 T抗原のNLS配列を含むプラスミドpEF/myc/nucが、Invitrogen社から市販されている。

【0049】

本発明において、Cip/Kipファミリー蛋白とは、一般の真核細胞において、細胞周期の進行を負に調節するCDK阻害因子の1つのファミリーを構成する一連の蛋白質群であり、p21^{cip1}、p27^{Kip1}、及びp57^{Kip2}の3種の分子を含む。Cip/Kipファミリー蛋白は、種々のサイクリン-CDK複合体、例えばサイクリンD-CDK4/CDK6、サイクリンA/E-CDK2等の機能を阻害することが知られている（総説としてSherr & Roberts、Genes Dev. 9:1149, 1995を

参照)。

【0050】

Cip/Kipファミリー蛋白の中でも、特に $p27^{Kip1}$ は、その機能並びに特性に関する解析が進められている。 $p27^{Kip1}$ は、TGF- β 刺激による細胞周期を停止した細胞において、サイクリンE-CDK2複合体と結合する因子として最初に同定され(Koffら、Cell 66:1217, 1991)、G1期停止に関わる負の細胞周期調節因子であることが公知である。例えば、哺乳動物細胞における $p27^{Kip1}$ 蛋白の過剰発現は、G1期における細胞周期停止を誘発する(Polyakら、Cell 79:59, 1994; Toyoshima & Hunter Cell 78:67, 1994)。更に、静止期の細胞において、 $p27^{Kip1}$ の発現が高いことから、細胞のG0期維持に $p27^{Kip1}$ が重要な役割を担っていることも示された(Nourseら、Nature 372:570, 1994)。その後の研究により、 $p21^{cip1}$ 及び $p57^{kip2}$ は $p27^{Kip1}$ とよく似た構造、機能並びに特性を有することが明らかにされてきている(Mainprizeら、J. Neurooncol. 51:205, 2001; Conqueret, Trends. Cell Biol. 13:65, 2003)。そこで、特に限定した記載がなければ、以下、Cip/Kip(ファミリー)蛋白とは、 $p21^{cip1}$ 、 $p27^{Kip1}$ 、及び $p57^{kip2}$ の3種、より好ましくは $p27^{Kip1}$ を意味するものとする。

【0051】

本発明の実施において、Cip/Kipファミリー蛋白の機能や働きを阻害する方法は、特にこれを限定しないが、その一例として、Cip/Kip蛋白の活性を抑制する方法は、例えば当該蛋白の機能や働きを阻害する中和抗体や、低分子化合物等を細胞内に導入する方法を挙げることができる。また、Cip/Kip蛋白の分解促進を誘導し得る方法としては、特にこれを限定しないが、当該蛋白のユビキチン化を促す方法が好適である。

【0052】

ユビキチンは全ての真核細胞中に豊富に存在するポリペプチドであり、Cip/Kipファミリー蛋白の細胞内における発現レベルは、主としてユビキチン経路を介した分解系によって調節されている(Paganoら、Science 269:682, 1995; Maki & Howley, Mol. Cell Biol. 17:355, 1997; Uranoら、J. Biol. Chem. 274:12197, 1999)。即ち、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン複合化酵素(E2)及びユビキチン・リガーゼ(E3)の機能や働きによって、ポリユビキチン鎖がCip/Kip蛋白へ共有結合(ユビキチン化)した後、最終的に26Sプロテアソームにより分解される。そのため、Cip/Kip蛋白のユビキチン化を促すことができる分子を心筋細胞内に導入する方法は、本発明を実施するにあたり好適である。心筋細胞に導入する物質としては、Cip/Kip蛋白のユビキチン化を促す作用を有していれば良く、具体的には薬剤や、蛋白、ペプチド、低分子化合物等を挙げることができるが、好ましくは核酸、即ち遺伝子の使用が望ましい。この様な遺伝子としては、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン複合化酵素及びユビキチン・リガーゼを構成する蛋白質をコードする遺伝子を挙げることができるが、特定の標的蛋白をユビキチン化するための特異性に関与しているのはユビキチン・リガーゼ(複合体)であると考えられているため、ユビキチン・リガーゼ(複合体)を構成する蛋白分子をコードする遺伝子を用いることが好ましい。

【0053】

現在、ユビキチン・リガーゼとしては、APC/C複合体やVBC複合体、SCF複合体、更にはNedd4、Ufd4、Rad5、Rad18、Parkin等、数多くの分子種が知られている。また、SCF複合体には、構成因子として含むF-ボックス蛋白の違いにより、 $SCF^{\beta TrCP}$ 、 SCF^{Cdc4} 、 SCF^{Met30} 、 SCF^{Grr1} 等の複数の種類が存在している(Pattonら、Trends Genet. 14:236, 1998; Jackson & Eldridge, Mol. Cell 9:923, 2002)。Cip/Kip蛋白のユビキチン化に関与するユビキチン・リガーゼ(複合体)としては、 SCF^{Skp2} とよばれるものが公知であり、当該複合体の構成因子をコードする遺伝子を使用することが好ましいが、これに限定されず、Cip/Kip蛋白のユビキチン化を促す作用を有しているユビキチン・リガーゼであれば、その構成因子をコードする遺伝子も使用できる。 SCF^{Skp2} を構成する分子の中、特にSkp2とよばれるF-ボックス蛋白が、Cip/Kip蛋白を認識、結合し、当該蛋白にポリユビキチン鎖を付加させることが知られている(Carranoら、Nature Cell Biol. 1:193, 1999; Tsvetkov

ら、Curr. Biol. 9:661, 1999; Bornsteinら、J. Biol. Chem. 278:26752, 2003; Kamuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10231, 2003)。そのため、本発明の実施にあたり、心筋細胞内に導入する遺伝子としては、Skp2蛋白をコードする遺伝子（以下、Skp2遺伝子と称することがある）の使用が好適である。

【0054】

Skp2遺伝子は、既にヒト（Zhangら、Cell. 82:915, 1995）、マウス（Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, 2000; 中山ら、特開2001-224380号公報）、ラット等の動物で単離・同定され、その塩基配列が報告されている。又、その配列情報は、ジェンバンク等の公共のDNAデータベースにおいて利用可能である（ヒトSkp2: U33761、AY029177; マウスSkp2: AF083215、BC003468）。そのため、当業者であれば、Skp2遺伝子に特異的なプライマー又はプローブを設計し、一般的な分子生物学的手法を用いることにより、Skp2遺伝子を取得・使用することが可能である。本発明の実施に用いるSkp2遺伝子は、ヒト、マウス、又はラット等、哺乳動物由来Skp2遺伝子であれば、同様の結果が得られる。

【0055】

なお、本発明の実施において、心筋細胞に導入する遺伝子としては、Skp2遺伝子のみならず、Skp2と同様、Cip/Kip蛋白のユビキチン化及び／又は分解を促進する因子をコードする遺伝子（以下、Cip/Kip蛋白の分解促進遺伝子と呼ぶ）であれば使用可能である。例えば、Cip/Kip蛋白を認識・結合し得るF-ボックス蛋白、又はSkp2の基質認識・結合部位と考えられているWD-40リピート又はロイシン・リッチ・リピートと呼ばれるモチーフ領域のアミノ酸配列に対して、80%以上、より好ましくは90%以上のホモロジーを有するF-ボックス蛋白、更にはCip/Kip蛋白のユビキチン化を促す性質を有したユビキチン・リガーゼ複合体の構成因子等をコードする遺伝子等も、使用可能である。

【0056】

また、直接、Cip/Kip蛋白のユビキチン化に関与しなくとも、p27^{Kip1}蛋白と特異的に結合及び／又は作用し、その分解を促す作用を有する因子であれば、これら蛋白をコードする遺伝子も、本発明に係る方法に利用できる。このような遺伝子としては、核膜孔結合蛋白であるNucleoporin50（Nup50、NPAP60、p163とも称される）（Buerginら、欧州特許第926,236号; Muellerら、EMBO J. 19:2168, 2000; Smithermanら、Mol. Cell. Biol. 20:5631, 2000; Buerginら、米国特許第6,265,562号）や、Cop9シグナロソームの構成因子であるJab1/CSN5（Tomodaら、J. Biol. Chem. 277:2302, 2002）等が報告されている。また、p27^{Kip1}は10位のセリン残基がリン酸化されると、核外移行トランスポーターであるCRM1と結合し、核外に移行し分解されることが知られている（Ishidaら、J. Biol. Chem. 277:14355, 2002; Connorら、Mol. Biol. Cell 14:201, 2003）が、当該蛋白の10位セリン残基を特異的にリン酸化する酵素として、KIS（Kinase interacting stathmin）が同定されており（Boehmら、EMBO J. 21:3390, 2002）、このKISをコードする遺伝子を利用する方法も、本発明の実施形態として含むことができる。本発明においてはCip/Kipファミリー蛋白の分解を促す目的で、上記因子又は当該因子に係る遺伝子を単独で又は複数組み合わせ用いてもよい。

【0057】

上記の通り、本発明を実施するための好適な方法の一例は、サイクリン及びCDKのどちらか少なくとも一方にNLSを付加した遺伝子と、更に、上記Cip/Kip蛋白の分解促進遺伝子を、心筋細胞に導入し、発現させることを特徴としている。好ましくは、これらの遺伝子は、心筋細胞をはじめとする広範な哺乳動物細胞における遺伝子の転写および発現を可能にする核酸配列、いわゆるプロモーター配列と、当該プロモーターの制御下に転写・発現が可能になる様な形で連結される。又、転写・発現させる遺伝子は、更にポリA付加シグナルと連結されることが望ましい。好適なプロモーターとしては、SV（Simian virus）40ウイルスやサイトメガロウイルス（Cytomegaro virus; CMV）、ラウス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus）等のウイルスに由来するプロモーターや、 β -アクチン・プロモーター、EF（elongation factor）1 α ・プロモーター等が挙げられる。また、トリ β -アクチン・プロモーターにCMVのエンハンサー及びウサギ β -グロビン遺伝子のポリA付加シグナル

配列を組み込んだハイブリッド・プロモーターであるCAGプロモーター (Niwaら、Gene 108:193, 1991) は、特に好適である。

【0058】

別の実施形態において、遺伝子の転写・発現のために使用するプロモーターは、心筋細胞特異的プロモーターである。この場合も、転写・発現させる遺伝子は、更にポリA付加シグナルと連結されることが望ましい。心筋特異的プロモーターとしては、例えば、心筋特異的ミオシン軽鎖 (Leeら、J. Biol. Chem. 267:15876, 1992) やミオシン重鎖プロモーター、更には心筋特異的心臓アンキリン反復蛋白質 (cardiac ankyrin repeat protein: CARP) プロモーター (Cuoら、Development 126:4223, 1999; 国際公開第W000/15821号) を挙げることができる。これらプロモーターの塩基配列は、ジェンバンク等の公共のDNAデータベースにおいて利用可能であり、一般的な分子生物学的手法を用いることにより、所望の遺伝子配列を利用した遺伝子ベクターを作製することが可能である。

【0059】

本発明においては、上記Cip/Kipファミリー蛋白の分解を促す方法の代わりに、当該蛋白をコードする遺伝子の発現 (mRNAの転写) を抑制する方法、又は当該遺伝子産物の翻訳・産生を阻害する方法も利用可能である。即ち、Cip/Kipファミリー蛋白をコードする遺伝子 (以下、Cip/Kip蛋白遺伝子と称する) 又は当該蛋白の発現を誘導し得る因子をコードする遺伝子の発現を抑制又は停止させ得るオリゴ核酸又はその誘導体等を細胞内に導入すれば良い。本発明において、オリゴ核酸の誘導体とは、当該核酸の細胞内における安定性や細胞内への取り込み効率を高めることを目的として、核酸の任意の部位に化学的な修飾・付加・置換を施した化合物を意味する。例えば、ホスホロチオエート化したオリゴ核酸、又はウリジン若しくはシチジンを、それぞれ2'-フルオロウリジン若しくは2'-フルオロシチジンに置換したオリゴ核酸等を挙げることができる。

【0060】

本目的のために利用できるオリゴ核酸としては、アンチセンスDNAやリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、デコイDNA等が公知であるが、最近、二本鎖RNAを用いたRNA干渉 (RNA interference; 以下、RNAi) 法が確立された。RNAiとは、標的遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する二本鎖RNAを細胞内に導入すると、標的遺伝子の内在性mRNAが特異的に分解される現象である。当初、哺乳動物ではRNAiを特異的な遺伝子抑制手法として利用するのは困難であると考えられていたが、RNAiの中間産物である短い二本鎖RNA (short/small interfering RNA; siRNAと称される) を利用することにより、哺乳動物細胞にRNAiを使用できることが明らかになった (Hammondら、Nat. Rev. Genet. 2:110, 2001; Elbashirら、Nature 411-494, 2002)。siRNAに関する総説、並びに作製法や使用法については、複数の参考書籍、例えば、RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology (Engelke編、DNA Press, 2004) やRNA Interference, Editing, and Modification; Methods and Protocols (Gott編、Humana Press, 2004) 等を参照することができる。

【0061】

siRNAは一般的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法または化学合成により容易に作製することができる。siRNAの効果は配列特性に依存することが知られており、Cip/Kip蛋白遺伝子に特異的なsiRNAは、当該遺伝子の遺伝子配列、好ましくは開始コドンから300塩基の配列を基に作製することができる。RNAiに用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。当該遺伝子の塩基配列情報は、ジェンバンク等の公共のDNAデータベースにおいて利用可能であり、例えばヒトやマウス、ラットのp27^{Kip1}遺伝子の場合、それぞれアクセス番号: U10906、U10440、D83792として登録されている。また、より効果的なsiRNAを設計するための方法やプログラムが複数、報告されている (Chalkら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 319:264, 2004; Ui-Teiら、Nucl. Acids Res. 32:936, 2004; Reynoldsら、Nat. Biotechnol. 22:326, 2004)。そのため、当業者であれば、p27^{Kip1}遺伝子等、Cip/Kip蛋白遺伝子に特異的なsiRNAを作製・使用す

ることが可能である。

【0062】

上記の方法で作製されたsiRNAはオリゴ核酸又はその誘導体の形で使用することも可能であるが、その発現効率や効果持続期間等の面から、RNA発現ベクターに組み込んだ形で使用することが好ましい。RNA発現ベクターとしては、siRNAを発現し得るプロモーターを有したものであれば特にこれを限定しないが、短いRNAの発現に適したPol. IIIプロモーター、その中でもU6やH1プロモーターの利用が好ましい。また、転写産物を積極的に細胞質に局在させることが可能なtRNAプロモーターの使用も好ましい。これらのプロモーターを利用可能なsiRNA発現用ベクターは、Ambion社やInvitrogen社、TAKARA BIO社、iGENE社等から購入可能である。

【0063】

上記の遺伝子又は遺伝子ベクターの導入のための方法としては、公知の方法がすべて使用可能であり、例えばリン酸カルシウムや電気パルスを用いたトランスフェクション法や、リポソームなどに目的の遺伝子を封入した上で細胞にトランスフェクションする方法、及びレトロウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターに目的の遺伝子を組み込み、その組み換えウイルスを細胞に感染させる方法等が挙げられる。この場合、ウイルスベクターとは、ウイルスDNAまたはRNAの全長若しくは一部を欠損・変異させた核酸配列に、目的とする遺伝子を組み込み、発現することができるようにした構築物である。

【0064】

ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ニワトリポックスウイルス、SV40を代表とするパポバウイルス等に由来するベクターが例示されるが、好ましくは、アデノウイルスベクターやAAVベクター、又はレンチウイルスベクターを使用することによって、効率的な遺伝子導入と導入した遺伝子の高レベル発現を行うことができる。アデノウイルスやAAVベクター、レンチウイルスベクターによる遺伝子の導入は、哺乳動物の細胞に遺伝子を導入する最も強力な方法の一つであり、事実上、すべての種類のヒト細胞及び多くの非ヒト細胞に導入するために使用できる。また、これらのウイルスによる感染は細胞周期に依存しないため、様々な初代培養細胞系および形質転換細胞系で遺伝子を発現させることができる。特に心筋細胞のようにDNA合成や細胞分裂を起こさない細胞でも効率良く遺伝子導入ができる。感染後に多くの細胞が組換えDNAのコピーを複数受け取ることから、導入された遺伝子は一時的に高レベルに発現する。アデノウイルスの場合、通常、DNAは細胞ゲノムに組込まれず、エピソードとしてとどまる。その結果、アデノウイルスベクターを使用した場合には、外来DNAが宿主細胞ゲノムに組込まれた時にランダムに発生する突然変異誘発性のエラーは殆ど生じないという利点もある。

【0065】

本発明の好ましい形態において用いられるアデノウイルスベクターは、ヒト胎児腎臓293細胞又は大腸菌を宿主とした相同組換えを用いた方法 (Miyakeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1320, 1996) や、簡単なin vitroライゲーションによる方法 (Mizuguchiら、Hum. Gene Ther. 9:2577, 1998) により調製することができる。アデノウイルスは二本鎖DNAゲノムを有するDNAウイルスの一つであり、最も良く研究されているのは、ヒトのアデノウイルス5型と2型である。これらの野生型アデノウイルスのE1及びE3遺伝子の大部分を欠失することにより、複製能のないウイルスベクターを作製することができ、ウイルス粒子形成に有害な作用を及ぼすことなく、数kbの外来DNAを挿入することが可能となる。この組換えアデノウイルスは、転写調節因子であるE1遺伝子を欠いているが、挿入した遺伝子特異的な転写ユニットによって、標的細胞の増殖や、その他のウイルス遺伝子の有無に依存せずに、挿入した目的遺伝子のみを発現させることができる。

【0066】

アデノウイルスベクター及び他のウイルスベクターの総説、並びに作製法や使用法に関して、実施者は、複数の参考書籍を参照することができる。例えば、Gene Therapy Protocols: Methods in Molecular Medicine (Robbins編、Humana Press、1997)、Gene Trans

fer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications (March編、Kluwer Academic Publishers、1997)、Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Curiel & Douglas編、Academic Press、2002)等を挙げることができる。また、アデノウイルスベクターを作製するためのキットも市販されており、例えばタカラバイオ株式会社が市販しているAdenovirus Expression Vector Kit (#6170)が、本発明の実施に利用可能であり、本発明者らが実際に成功例を報告している(Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, 2000; 前掲の特許文献1及び非特許文献5参照)。

【0067】

本発明においては、サイクリン遺伝子とCDK遺伝子、更に、上記Cip/Kip蛋白の分解促進遺伝子といった複数の遺伝子を発現させる場合、これらの2種若しくは3種の遺伝子を、同一のウイルスベクターに組み込んで感染させることも、又は個別の組換えウイルスとして感染させることもできる。複数の組換えウイルスによって共感染させる場合は、これらを同時に感染させても良いし、一定時間をおいて別々に感染させても良い。本発明において感染させるウイルス量は、例えば $10^7 \sim 10^{13}$ pfu/mL、好ましくは $10^9 \sim 10^{12}$ pfu/mLのウイルス保存液を用い、培養細胞の場合には、細胞当たり好ましくは100個程度(moi = 100)に調整した上で感染させることが望ましい。また、ウイルス量の測定(力価測定)は、プラーク・アッセイにより容易に行うことができる。

【0068】

本発明の別の態様として、(1)サイクリン遺伝子、(2)CDK遺伝子、(3)Cip/Kip蛋白の分解促進遺伝子又はCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸(若しくはその誘導体)の何れか1つ又は複数の代わりに、当該遺伝子発現の効果と同等の作用を有する低分子化合物、即ち、サイクリン蛋白と類似作用を呈する化合物やCDK蛋白と類似作用を呈する化合物、Cip/Kip蛋白の分解促進作用を呈する化合物、或いはCip/Kip蛋白の産生阻害作用を呈する化合物等を利用することもできる。この場合、当該化合物を心筋細胞内に導入する方法としては、特にこれを限定しないが、一般的には、緩衝生理食塩水等の薬学的に受容可能な薬剤キャリアや希釈液中に当該化合物を溶解し、経口投与、静脈注射、腹腔内注射、経皮投与、皮下注射、更には心組織内の直接注入等の投与形態を用いることができる。また、心筋細胞が培養細胞の場合、培地に当該化合物を直接、添加することもできる。

【0069】

(遺伝子治療法としての適用)

本発明の別の態様として、本発明の実施に用いる遺伝子ベクター、好ましくはウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター又はAAVベクターを含む、遺伝子治療用医薬組成物が提供される。この遺伝子治療用医薬組成物は、心筋再生薬又は心臓疾患治療薬として用いることができ、対象となる心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全等を挙げることができる。

【0070】

医薬組成物の形態は特に限定されないが、例えば、緩衝化生理食塩水等の薬学的に受容可能な薬剤キャリアや希釈液中に本発明の遺伝子発現ベクターを含む、注射可能な調製物の形態であり得る。薬剤キャリアとしては、その他に適当な安定剤(例えば、ヌクレアーゼ阻害剤など)、キレート剤(例えば、EDTAなど)、及び/又はその他の助剤も含むことができる。なお、本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減して用いる必要があるが、一般的には、成人1回当たりは有効成分のDNA量として $1.0 \mu\text{g/kg} \sim 1.0 \text{g/kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10 \mu\text{g/kg} \sim 100 \text{mg/kg}$ 程度の範囲である。又、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを用いる場合、ウイルスの最終的な力価は、好ましくは $10^7 \sim 10^{13}$ pfu/mL、更に好ましくは $10^9 \sim 10^{12}$ pfu/mLであることが望ましい。

【0071】

本発明の医薬組成物は、特に遺伝子発現ベクターが非ウイルス性ベクターである場合、

リポソームとの複合体として供給してもよい。このような形態によって、特に心筋細胞において高いトランスフェクション効率を実現できる可能性がある。リポソームの具体例としては、N-[2,3-(dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) や diol eoylephosphatidylethanolamine (DOPE) などを含む多くの新しい脂質製剤が開発され、様々な細胞系を用いたトランスフェクションが試験されている (Banerjee, J. Biomater. Appl. 16:3, 2001; Maurerら、Expert Opin. Biol. Ther. 1:923, 2001)。また、日本血球凝集性ウイルス (HVJ; センダイウイルス) 由来の融合形成性エンベロープを持つ融合形成性ウイルスリポソームを用いた方法、いわゆるHVJ-リポソーム法 (Yonemitsuら、Int. J. Oncol. 12:1277, 1998; Kanedaら、Mol. Med. Today 5:298, 1999) も有効である。

【0072】

上記の遺伝子発現ベクターまたはそれを含む医薬組成物は、心疾患患者の心臓の全体に導入しても良いが、障害部位に限局した導入を行うことが好ましい。この場合、遺伝子発現ベクターまたはそれを含む医薬組成物を障害部位に導入する方法としては、開胸した上で注射器を用いて直接心臓に注入する方法や、カテーテルを用いた経血管的方法を挙げることができ、注入部位は血管内若しくは心筋層内のどちらでも良い。このようなカテーテル等を用いた外科的手術手技は、当該分野で公知であり、参考書籍として、例えば、Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications (March編、Kluwer Academic Publishers、1997) や、Vascular Surgery 第5版 (Rutherford、W.B. Saunders、2000)、Textbook of Interventional Cardiology 第4版 (Topol編、W.B. Saunders、2002) 等の成書を挙げることができる。また、上記の方法を実施するために用いるカテーテルは、Boston Scientific社やEdwards Lifesciences Corporation社等から購入することができる。

【0073】

(本発明の方法により増殖させた心筋細胞の利用)

本発明に係る方法により増殖させた心筋細胞は、引き続き、公知の方法による細胞回収、分離、精製法を用いることにより、高純度の心筋細胞を効率的かつ多量に得ることができる。この様にして得られた心筋細胞を以下、本発明により調製された心筋細胞と呼ぶ。

【0074】

心筋細胞の精製方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、その具体的例として、フローサイトメーターや磁気ビーズ、パンニング法等の抗原-抗体反応に準じた方法や、ショ糖、パーコール等の担体を用いた密度勾配遠心による細胞分画法を挙げることができる。また、別の心筋細胞選別法としては、前もって心筋細胞ソースとなる動物又はES細胞等の幹細胞の遺伝子に、人為的に薬剤耐性や異所性蛋白の発現能を付与する様な修飾を加え、これらの指標をもとに心筋細胞を選択的に回収する方法が挙げられる。例えば、Fieldおよび共同研究者らは、 α 型ミオシン重鎖プロモーターの制御下でネオマイシン (G418) 耐性遺伝子を発現し得る遺伝子カセットを、マウスES細胞に導入することにより、そのES細胞が心筋細胞に分化し、それに伴い α 型ミオシン重鎖遺伝子を発現した時のみ、G418を添加した培地中で生存し得る系を構築し、この方法によりG418耐性細胞として選別された細胞は、99%以上の確率で心筋細胞であることを報告している (米国特許第6,015,671号; J. Clin. Invest. 98:216, 1996)。

【0075】

本発明のまた別の態様として、本発明により調製された心筋細胞は、各種生理活性物質 (例えば、薬物) や機能未知の新規遺伝子産物などの薬理評価および活性評価に有用である。例えば、心筋細胞の機能調節に関する物質や薬剤、又は心筋細胞に対して毒性や傷害性を有する物質や薬剤のスクリーニングに利用することができる。さらなる態様では、本発明により調製された心筋細胞を含む評価キットは、上記スクリーニングのために有用である。

【0076】

スクリーニングに供する被験物質としては、培養系に添加できるものであれば種類を問わず、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、ペプチ

ド、遺伝子、ウイルス、細胞、細胞培養液、微生物培養液などが挙げられる。遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス等のウイルスベクターを用いて培養系に添加する方法、又はリポソーム等に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。

【0077】

被験物質の評価は、心筋細胞機能の質的又は量的な変化を測定することで行なうことができる。心筋細胞の生存性を一例として挙げると、本発明により調製された心筋細胞を、適切な細胞密度になるように培養プレートに播種し、血清を含まない培地で培養すると細胞死（アポトーシス）を誘導することができるが、その際、適当量の被験物質を培地中に添加し、心筋細胞の生存率又は死亡率を測定すれば良い。心筋細胞の生存率又は死亡率の測定方法としては、トリパンプルー等の色素の取り込みを指標とした肉眼的な観察によるものでも良いし、脱水素酵素の活性（還元活性）を指標とした方法、さらにはアポトーシス細胞に特異的なカスパーゼ活性やアネキシンVの発現を指標とした方法を用いても良い。当該メカニズムを利用したキットは、Sigma社やClonetech社、Promega社等、多くのメーカーより当該メカニズムを利用したキットが市販されており、容易に使用することができる。

【0078】

上記スクリーニング方法により得られた物質や薬剤は、心筋細胞の分化誘導作用や機能調節作用を有するため、例えば心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全などの心疾患予防薬又は治療薬として用いることができる。これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0079】

また、本発明により調製された心筋細胞は、心筋再生又は心臓疾患治療用の移植用細胞として用いることができる。心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全などを挙げることができる。移植用細胞としては、本発明により調製された心筋細胞を高純度で含むものであれば、細胞を培地等の水性担体に浮遊させたもの、細胞を生体分解性基質等の固相担体に包埋したもの、あるいは単層もしくは多層の心筋細胞シート（Shimizuら、Circ. Res. 90:e40, 2002）に加工したもの等、どのような形状のものでも用いることができる。

【0080】

上記の移植用心筋細胞を障害部位に移植する方法としては、開胸し、注射器を用いて直接心臓に注入する方法、心臓の一部を外科的に切開して移植する方法、さらにはカテーテルを用いた経血管的方法により移植する方法等（Murryら、Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 67:519, 2002；Menasche、Ann. Thorac. Surg. 75:S20, 2003；Dowellら、Cardiovasc. Res. 58:336, 2003）が挙げられるが、特にこれを限定しない。このような方法により、胎児心臓から回収した心筋細胞を心障害動物の心臓に移植すると、きわめて良い治療効果を示すことが報告されている（Menasche、Ann. Thorac. Surg. 75:S20, 2003；Reffelmannら、Heart Fail. Rev. 8:201, 2003）。ES細胞由来の心筋細胞は、胎児心臓由来の心筋細胞ときわめてよく似た形質を呈している（Maltsevら、Mech. Dev. 44:41, 1993；Circ. Res. 75:233, 1994）。また、実際にES細胞由来の心筋細胞を成体心臓に移植した動物実験例では、胎児心筋を移植した例とほぼ変わらない、極めて高い生着性を示すことも確認されている（Klugら、J. Clin. Invest. 98:216, 1996）。そのため、心筋細胞の疲弊および脱落に起因する上記の心疾患において、本発明記載の方法により調製した心筋細胞を、病的な心臓組織に補充的に移植することにより、心機能の改善を促すことが期待できる。

【実施例】

【0081】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、以下の実施例は本発明の単なる例示を示すものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0082】

〔実施例 1: 組換えアデノウイルスの調製〕

CDK4遺伝子、核移行シグナル (NLS) をコードする塩基配列を付加したサイクリンD1 (D1NLS) 遺伝子、又はSkp2遺伝子を含むアデノウイルスベクターは、組み換えアデノウイルス作製キット (Adenovirus Expression Vector Kit; タカラバイオ) を用いて作製した。

【0083】

即ち、CDK4遺伝子を含むアデノウイルスベクター、Ad-CDK4の場合、プラスミドpCMV-CDK4 (Sander van den Heuvel博士 [Massachusetts General Hospital Cancer Center; 米国] より入手; van den Heuvelら、Science 262:2050, 1993) をBamHIで切断することによりマウスCDK4 cDNA断片を調製し、その末端をT4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑化した後、上記組み換えアデノウイルス作製キットに添付のプロトコールに従い、コスミドpAxCawtのSwaI部位に挿入してコスミドpAd-CDK4を作製した。続いてこのコスミドと、ヒトアデノウイルス5型のゲノムDNAに由来する制限酵素処理済みDNA-TPC (ターミナルペプチドコンプレックス) とをヒト胎児腎臓由来の293細胞へトランスフェクションさせることにより、組換えアデノウイルス、Ad-CDK4を作製した。

【0084】

D1NLS遺伝子を含むプラスミドは、pRSV-cyclinD1 (Matsushimeら、Cell 65:701, 1991) 由来のマウスサイクリンD1 cDNA断片と、pEF/myc/nuc (Invitrogen) 由来のNLSを連結して構築した。即ち、プラスミドpEF/myc/nucを制限酵素NcoI及びXhoIで切断してNLS配列を含む第一のDNA断片を調製した。次にプラスミドpRSV-cyclinD1を制限酵素NcoIで切断し、サイクリンD1配列を含む第二のDNA断片を調製した。更に、プラスミドpRSV-cyclinD1を鋳型として以下の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、サイクリンD1 cDNAのC末端側をコードする第三のDNA断片を調製した。

【0085】

5'-プライマー: 5'-ACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGA 3' (配列番号2)

3'-プライマー: 5'-TGATCTCGAGGTCGATGTCCACATCTCGCACGT-3' (配列番号3)

【0086】

これらの3種類のDNA断片をT4 DNA リガーゼを用いて連結し、マウスサイクリンD1 cDNAのC末端側にSV40 Large T抗原由来の核移行シグナル (NLS) を重複して3回コードする塩基配列を有するプラスミドを構築した。このプラスミドから制限酵素PmaCI及びSmaIで切り出したDNA断片を、上記と同様にコスミドpAxCawtのSwaI部位に挿入し、このコスミド (pAd-D1NLS) と制限酵素処理済みDNA-TPCを293細胞にトランスフェクションして、組換えアデノウイルス、Ad-D1NLSを作製した。

【0087】

Skp2を含むアデノウイルスベクターAd-Skp2は、マウスSkp2 cDNAを基に作製した。マウスSkp2 cDNAは、GenBankに登録されているマウスのEST (expressed sequence tag) クローン (Accession No. AA511897) をプローブとして、マウス胸腺cDNAライブラリー (Stratagene) から単離した (中山ら、特開2001-224380号明細書)。即ち、上記ESTクローンから常法に基づいて³²P標識プローブを作製し、cDNAライブラリーを基に作製したレプリカフィルターと当該プローブを緩衝液中で68℃、24時間ハイブリダイズした後、0.1%のSDSを含有する緩衝液を用いて68℃で洗浄した。得られた陽性クローンをpBluescript SK (Stratagene) プラスミドにサブクローニングし、その塩基配列の決定を行った。なお、このようにして決定されたマウスSkp2 cDNAの塩基配列は、GenBankに登録済みである (Accession No. AF083215) (Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, 2000; 中山ら、特開2001-224380号明細書)。上記マウスSkp2 cDNAを鋳型として、以下の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、N末端にFlagタグ配列 (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C; 配列番号4) を有したマウスSkp2 cDNA断片を調製した後、pcDNA-3ベクター (Invitrogen) のXhoI部位に挿入し、pcDNA3-Flag-Skp2ベクターを作製した。

【0088】

5'-プライマー: 5'-ATACTCGAGGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCATAGGAAGCACCTTCAGGAGATT-3' (配列番号5)

3'-プライマー: 5'-ATACTCGAGTCATAGACAAGCTGGGCTTTTGCAG-3' (配列番号 6)

【0089】

次にpcDNA3-Flag-Skp2ベクターをXhoIで切断して得たSkp2 cDNAを含む断片を、上記と同様にコスミドpAxCawtのSwaI部位に挿入し、このコスミドと、ヒトアデノウイルス5型のゲノムDNAに由来する制限酵素処理済みDNA-TPC (ターミナルペプチドコンプレックス) とをヒト胎児腎臓由来の293細胞へトランスフェクションさせることにより、組換えアデノウイルス、Ad-Skp2を作製した。

【0090】

上記の方法で作製した3種の組換えアデノウイルス (Ad-CDK4、Ad-D1NLS、及びAd-Skp2) は、CAGプロモーター (CMVエンハンサー、トリβ-アクチン・プロモーター、ウサギβ-グロビン遺伝子のポリA付加シグナル配列) の制御下で各挿入遺伝子が発現する構築になっており、哺乳動物の細胞内で高発現させることが可能である。

【0091】

引き続き、各組み換えウイルスについて、高力価ウイルス液の回収を行った。上記の3種のコスミド (pAd-CDK4、pAd-D1NLS及びpAd-Skp2) 各4μgを、上記組み換えアデノウイルス作製キットに添付の制限酵素処理済みDNA-TPC 2.5μlと混合し、それぞれ培養ディッシュ (直径60mm) で培養した293細胞に、FuGENETM6 Transfection Reagent (Roche) を用いたりポフェクション法によりトランスフェクションを行った。翌日、細胞を剥がし、回収した細胞懸濁液を、それぞれコラーゲンコートした培養プレート (96ウエル) に播き直した。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウエルが7~15日の間に現れたので、細胞が完全に死滅したウエル毎に培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解を6回繰り返し、遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) して回収した上清を、1次ウイルス液として-80℃で保存した。この1次ウイルス液10μlを、コラーゲンコートした培養プレート (24ウエル) に培養した293細胞に感染させ、3~4 日後に細胞が死滅したウエルの培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解を6回繰り返し、遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) して回収した上清を、2次ウイルス液として-80℃で保存した。この2次ウイルス液 15μlを、コラーゲンコートした培養用フラスコ (25 cm²) に培養した293細胞に感染させ、3~4 日後に細胞が死滅したウエルの培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解または密封型ソニケーターで破碎してウイルスを遊離させた。遠心分離 (3000 rpm, 10分間、4℃) して回収した上清を、3次ウイルス液として-80℃で保存した。この3次ウイルス液50μlを、コラーゲンコートした培養用フラスコ (75 cm²) に培養した293細胞に感染させ、3~4 日後に細胞が死滅したウエルの培養液を無菌的に滅菌チューブに移して、凍結融解または密封型ソニケーターで破碎してウイルスを遊離させた。遠心分離 (3000 rpm, 10分間、4℃) して回収した上清を、4次ウイルス液として-80℃で保存した。この4次ウイルス液の力価は、293細胞を用いてプラーク・アッセイにより決定したところ、いずれも常に10⁹~10¹¹ pfu/mLの範囲内であった。なお、本開示において、細胞当たりに感染させる生ウイルス粒子数を、以下、感染多重度 (multiplicity of infection; moi) で表記する。即ち、1つの細胞に1個のウイルス粒子を感染させた場合を、moi = 1と表す。

【0092】

〔実施例2: DNLS/CDK処理した心筋細胞におけるp27^{Kip1}蛋白質の蓄積〕

生後2~4日目のラット (Sprague-Dawley系) から心筋細胞を分離し、パーコール濃度勾配遠心分離によって心筋細胞画分を回収した (Tamamoriら, Am. J. Physiol. 275:H2036, 1998)。このようにして得られた細胞の95%以上は、抗サルコメア・アクチン抗体を用いた免疫染色によって心筋細胞であることを確認した。この新生仔ラット心筋細胞は、5%牛胎児血清 (FBS; Flow Laboratories) を添加したイーグル最小培地 (Flow Laboratories) に懸濁後に培養用ディッシュに播種し、炭酸ガスインキュベータ中、37℃で24時間培養した。次の日、培養液を無血清のイーグル最小培地に交換し、更に24時間培養した後、実施例1で調製した組み換えウイルスAd-D1NLS (moi = 10~100) 及びAd-CDK4 (moi = 100) を培地に添加し、48時間培養した。以下、組み換えウイルスAd-D1NLS及びAd-CDK4を心筋細胞に感染・導入 (トランスフェクション) し、心筋細胞の核内にサイクリンD1蛋

白およびCDK4蛋白を発現させることを、D1NLS+CDK4刺激、又はD1NLS+CDK4処理と呼ぶことがある。対照として、ラット線維芽細胞株であるREF52細胞を用いて同様の実験を行った。

【0093】

まず、D1NLS及びCDK4遺伝子を導入した心筋細胞において、p27^{Kip1}蛋白の発現を、ウエスタン (Western) プロット法にて検討した。Ad-D1NLS及びAd-CDK4ウイルスをトランスフェクションした細胞は、氷冷したPBS (Phosphate buffered saline) で洗浄した後、セルスクレイパーにてかき取り、遠心分離して上清を捨てた。得られた沈殿を少量のPBSでもう一度洗浄した後、1.5 mLのエッペンドルフチューブに移し、沈殿の5倍容量の氷冷したBuffer A (10 mM HEPES (pH7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT) を加えて攪拌した後、氷上にて10分間静置した。次にNONIDET P-40を最終濃度0.2%になるように加えて攪拌した後、5分間氷上にて静置した。更に遠心分離 (5,000回転、5分間) して得た沈殿に、等容量のBuffer C (20 mM HEPES (pH7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA) を加えて攪拌し、氷上にて30分間静置した後、遠心分離 (15,000 rpm、10分間) して上清を回収し、核蛋白分画として使用した。なお、上記Buffer A及びBuffer Cには、いずれも使用直前に、1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin (いずれもSigma) を添加した。

【0094】

この様にして得られた核蛋白質は、1サンプル当たり1 x 10⁶個の細胞に由来する量に調製した後、SDS-PAGE用ゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、ウエスタンプロット解析を行った。即ち、1次抗体として抗サイクリンD1抗体 (Oncogene Science; Ab-3) 又は抗p27^{Kip1}抗体 (Santa Cruz; sc-528) を反応させた後、2次抗体としてhorseradishペルオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体 (Amersham LifeScience; NA931) 又は抗ウサギIg抗体 (Amersham LifeScience; NA934) と反応させ、抗体と結合した抗原分子の存在を化学発光キット (Amersham Life Science; RPN2109) を用いて検出した。

【0095】

結果を図1に示す。以前の報告 (Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, 2000; 前掲の特許文献1及び非特許文献5参照) と同様、D1NLS及びCDK4遺伝子を心筋細胞にトランスフェクションすると、心筋細胞核内のサイクリンD1蛋白及びCDK4蛋白の発現量が高まることが確認できた。その際、p27^{Kip1}蛋白の発現は、サイクリンD1蛋白の発現量が高まるのに伴い、強く誘導された。一方、線維芽細胞 (REF52細胞) では、サイクリンD1蛋白の発現が増えたと、むしろp27^{Kip1}の発現量は減少し、両細胞において、D1NLS+CDK4刺激下におけるp27^{Kip1}蛋白の挙動に差異がみられた。

【0096】

引き続き、p27^{Kip1}蛋白の心筋細胞内における発現並びにその局在を抗体染色法にて調べた。上記の方法と同様、Ad-D1NLS及びAd-CDK4ウイルス (moi = 100) をトランスフェクションした心筋細胞を、ウイルス感染の48時間後に70%エタノールで固定した。次に抗p27^{Kip1}抗体 (同上) (1:1000希釈) 及び抗サルコメア・アクチン抗体 (DAKO; M0874) (1:100希釈) を反応させた後、Alexa FluorTM標識抗体 (Alexa-488およびAlexa-568; Molecular Probes) (ともに1:200希釈) を用いて染色した。また、細胞核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 (1 µg/mL) で染色した。これらの抗体や色素による染色像を、蛍光顕微鏡 (レーザースキャニング共焦点イメージシステム; ZEISS社 LSM510) 下にて観察した。

【0097】

その結果を図2に示した。通常的心筋細胞 (図中、サルコメア・アクチン陽性の細胞) では、p27^{Kip1}の発現は核内に見られるが、その発現はそれほど強くなかった。一方、D1NLS及びCDK4遺伝子を導入、発現させた心筋細胞では、p27^{Kip1}の強い発現ならびに核内集積が確認された。以上、図1及び図2の結果から、D1NLS及びCDK4遺伝子を心筋細胞で強制発現させることにより、心筋細胞の核内で細胞周期の進行を抑制するp27^{Kip1}蛋白の蓄積が誘導され、その結果として、D1NLS+CDK4刺激により誘導された心筋細胞の分裂・増

殖能が抑制されている可能性が示唆された。

【0098】

次に、D1NLS+CDK4刺激によるp27^{Kip1}発現量の増加が、転写レベルで制御されているかどうかについて調べるため、ノザン (Northern) プロット解析を行ったが、心筋細胞並びに線維芽細胞のどちらの細胞においても、D1NLS及びCDK4遺伝子の強制発現は、p27^{Kip1}mRNAの発現レベルに影響を及ぼさなかった。p27^{Kip1}は増殖性細胞において、ユビキチン-プロテアソーム分解系により発現蛋白量が抑制されていることが知られている (Carranoら、Nature Cell Biol. 1:193, 1999; Tsvetkovら、Curr. Biol. 9:661, 1999)。そこで、心筋細胞においてもp27^{Kip1}蛋白の発現量がプロテアソーム分解系により調節されているか否かについて検討した。上記の方法にて調製した心筋細胞を、血清飢餓状態で24時間培養した後、Ad-D1NLS及びAd-CDK4 (moi = 100) を培地に添加して48時間培養した。一方、別の群では、心筋細胞を血清飢餓状態で48時間培養した後、10%量のFBSを培地に添加して24時間培養した。その際、同時にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン (20 μ M) (Santa Cruz) を添加する群と添加しない群を設け、各処理群におけるp27^{Kip1}蛋白の発現量をウエスタンブロット法により調べた。

【0099】

その結果、D1NLS+CDK4刺激群では、図1と同様、p27^{Kip1}蛋白の発現量の顕著な増加が確認できた (図3)。一方、FBS刺激では、p27^{Kip1}の発現量は減少した。心筋細胞では、発明者らの以前の検討から、FBS刺激によりサイクリンD1蛋白及びCDK4蛋白の発現が増加するものの、これら分子の核内移行が起こらず、その結果として細胞周期の活性化に至らないことが明らかになっており (前掲の特許文献1及び非特許文献5参照)、心筋細胞におけるp27^{Kip1}蛋白量の増加は、サイクリンD1蛋白及び/又はCDK4蛋白の核内移行刺激に特異的であることが示唆された。一方、ラクタシスチン処理によりプロテアソームの機能や働きを抑制した場合、未添加群、FBS処理群、D1NLS+CDK4処理群のどの群においてもp27^{Kip1}蛋白の発現レベルに差が認められなかった。この結果は、未添加群やFBS処理群ではp27^{Kip1}蛋白が恒常的に分解されているが、D1NLS+CDK4処理群ではその機能や働きが阻害されていることを意味する。

【0100】

引き続き、心筋細胞におけるp27^{Kip1}蛋白質のユビキチン化能を検討するため、in vitro ユビキチン・アッセイを行った。詳細な実験方法は、基本的に本発明者らの既報告論文 (Nakayamaら、EMBO J. 19:2069, 2000; 中山ら、特開2001-224380号明細書; Haraら、J. Biol. Chem. 276:48937, 2001; Ishidaら、J. Biol. Chem. 277:14355, 2002) に記載した方法に準じている。まず、上記の方法にて調製した心筋細胞を、血清飢餓状態で24時間培養した後、Ad-D1NLS及びAd-CDK4 (moi = 100) を培地に添加して48時間培養した。一方、別の群では、血清飢餓状態で48時間培養した後、10%量のFBSを培地に添加して24時間培養した。また、対照として、10%FBS添加培地中で培養したREF52細胞を用いた。これらの細胞を氷冷したPBSで洗浄した後、セルスクレイパーにてかき取り、遠心分離して上清を捨てた。得られた沈殿に、0.5% NONIDET P-40を添加した2倍量のBuffer C (前述) を加えて攪拌し、氷上にて30分間静置した後、超音波破碎処理を行った。その後、遠心分離 (15,000 rpm、20分間) して回収した上清を、細胞抽出物として使用した。

【0101】

ユビキチン化反応の基質として用いるリコンビナントp27^{Kip1}蛋白は、ウサギ網状赤血球の細胞抽出物 (reticulocyte lysate) を用いたin vitro翻訳系により作製した。即ち、市販のin vitro転写・翻訳キット (TnT coupled Reticulocyte Lysate System; Promega) を用い、添付のプロトコールに従い、Flagタグ配列を付加したマウスp27^{Kip1} cDNAを鋳型として、in vitro転写並びに翻訳を行った。この様にして作製されたリコンビナントp27^{Kip1}蛋白と各細胞抽出サンプル (蛋白量として20~40 μ g) を、マウスE1蛋白 (50 μ g/mL)、マウスE2/Ubc5蛋白 (100 μ g/mL)、GST-Ub蛋白 (4 mg/mL) (いずれもCalbiochem) と共に、最終量10 μ Lの反応液 (4 mM Tris-HCl (pH7.5), 6 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.1 mg/mL クレアチンホスホキナーゼ, 10 mM ホスホクレアチン, 1.5 mM AT

P) に調製し、26℃、30分間反応させた。その後、当該サンプルは、SDS-PAGE用ゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、ウエスタンブロット解析を行った。即ち、1次抗体として抗Flag抗体 (Sigma; F-3165) 又は抗GST抗体 (Santa Cruz; sc-138) (ともに1:1000希釈) を反応させた後、2次抗体としてhorseradishペルオキシダーゼ標識抗マウスIg (同上) (1:1000希釈) と反応させ、抗体と結合した抗原分子の存在を化学発光キット (同上) を用いて検出した。

【0102】

結果を図4に示す。まず、陽性コントロールとして、増殖中の (FBS刺激下の) 線維芽細胞の細胞抽出物を用いてp27^{Kip1} 蛋白のin vitroユビキチン化反応を行ったもの (図中、REF) では、リコンビナントp27^{Kip1} 蛋白に付加されたFlagペプチドを認識する抗体 (図中、IB: Flag)、並びにリコンビナント・ユビキチン蛋白に付加されたGST蛋白を認識する特異抗体 (図中、IB: GST) を用いることにより、ユビキチン化をうけたp27^{Kip1} 蛋白の存在を明確に検出することができた。しかし、FBSで刺激した心筋細胞から調製した細胞抽出物を用いた場合は、p27^{Kip1} 蛋白に対して弱いユビキチン化しか認められず、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞では、ごく弱いユビキチン化p27^{Kip1} 蛋白のバンドしか検出できなかった。図3及び図4の示す結果から、D1NLS+CDK4刺激下の心筋細胞では、p27^{Kip1} 蛋白のユビキチン化が顕著に抑制されており、その結果としてプロテアソーム分解が起こりにくくなっているため、p27^{Kip1} 蛋白が核内に蓄積することが強く示唆された。

【0103】

【実施例3: Skp2強制発現による、心筋細胞に蓄積したp27^{Kip1} 蛋白の減少】

一般的な増殖性の細胞において、p27^{Kip1} 蛋白はF-box蛋白であるSkp2を含むユビキチンリガーゼ、SCF^{Skp2}複合体によりユビキチン化され、プロテアソーム分解されることが知られている (Carranoら、Nature Cell Biol. 1:193, 1999; Tsvetkovら、Curr. Biol. 9: 661, 1999)。そこで、心筋細胞におけるSkp2蛋白の発現をウエスタンブロット法により検討した。心筋細胞の調製、Ad-D1NLS及びAd-CDK4のトランスフェクション法、核蛋白質の調製、ウエスタンブロット解析等は、上述の方法と同じであるが、Skp2蛋白の検出のため、上述の抗Skp2抗体を用いた。

【0104】

結果を図5に示す。コントロール細胞として用いた線維芽細胞 (REF52細胞) では、増殖を促すFBS刺激及びD1NLS+CDK4刺激により、Skp2蛋白の発現は著しく亢進した。しかし、心筋細胞ではほとんどSkp2蛋白の発現誘導は認められず、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞では、ごく微量のSkp2蛋白しか検出することができなかった。この結果から、心筋細胞ではSkp2の発現誘導が起こらないため、D1NLS+CDK4刺激により蓄積したp27^{Kip1} 蛋白の分解が抑制されている可能性が考えられた。

【0105】

そこで、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞に、更にSkp2遺伝子を共発現させ、p27^{Kip1} 蛋白の発現に及ぼす影響を調べた。心筋細胞に、実施例1で調製したAd-D1NLS (moi = 100)、Ad-CDK4 (moi = 100) 及びAd-Skp2 (moi = 50, 100) をトランスフェクションし、48時間培養した後、サイクリンD1、Skp2及びp27^{Kip1} 蛋白の発現をウエスタンブロット法にて解析した。心筋細胞の調製、核蛋白質の調製、ウエスタンブロット解析等の方法は、上記記載の方法と同じである。

【0106】

D1NLS、CDK4、Skp2の3つの遺伝子を心筋細胞に共発現した結果を図6に示した。心筋細胞にD1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションすると、上述の実験 (図1、3) と同様、p27^{Kip1} 蛋白の発現が強く誘導された。その際、Ad-Skp2を心筋細胞にトランスフェクションし、Skp2遺伝子を共発現させると、p27^{Kip1} 蛋白の発現量は著しく減少し、高濃度 (moi = 100) のAd-Skp2を感染させた心筋細胞ではp27^{Kip1} 蛋白の発現はほとんど認められなくなった。

【0107】

図7では、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞におけるp27^{Kip1}蛋白の蓄積が、Skp2遺伝子の共発現により減少することを、更に免疫組織染色法を用いて確認した。免疫組織染色の方法は、上述の実験(図2)の方法と同じである。図2と同様、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞では、p27^{Kip1}の強い発現ならびに核内集積が観察された。一方、Skp2遺伝子を共発現させたところ、細胞の核内におけるp27^{Kip1}蛋白の著しい減少が認められた。また、D1NLS、CDK4並びにSkp2遺伝子を共発現した心筋細胞に対してラクタシスチン処理を行うと、p27^{Kip1}蛋白の発現レベルはD1NLS+CDK4刺激時と同程度に回復し、Skp2蛋白の強制発現によるp27^{Kip1}蛋白の減少は、ユビキチン-プロテアソーム分解系を介していることも確認された。

【0108】

〔実施例4：Skp2強制発現による心筋細胞増殖促進効果〕

心筋細胞にAd-D1NLS、Ad-CDK4、並びにAd-Skp2(それぞれmoi = 100)をトランスフェクションし、その後の細胞数を経時的に測定することにより、Skp2遺伝子導入が心筋細胞の増殖能に及ぼす影響を検討した。既報告(前掲の特許文献1及び非特許文献5参照)の結果と同様、D1NLS及びCDK4遺伝子を発現させた心筋細胞は、培養7日後にはその細胞数が約3倍に増加した(図8)。これに対し、D1NLS、CDK4、Skp2の三者を発現させた心筋細胞では、細胞数が5倍以上に増えることが確認できた。一方、陰性対照としてベクターのみのアデノウイルスを感染させた心筋細胞、並びにAd-Skp2のみを感染させた心筋細胞ではほとんど細胞数の増加は認められなかった。以上の結果から、Skp2はD1NLS+CDK4刺激により促進された心筋細胞の増殖能を、更に有意に促進し得ることが明らかとなった。

【0109】

〔実施例5：p27 siRNA処理による心筋細胞増殖促進効果〕

D1NLS+CDK4処理した心筋細胞におけるp27^{Kip1}蛋白の影響をより明らかにするため、心筋細胞内でp27^{Kip1}遺伝子に対する特異的なsiRNA(以下、「p27 siRNA」という。)を発現させ、その効果を検討した。

【0110】

p27 siRNA発現用ベクターを構築するため、ラットp27^{Kip1}cDNAの塩基配列情報(ジェンバンクのアクセス番号:D83792)を基にターゲット配列の決定、及び当該配列に相当するsiRNAを発現するベクターを構築する際に用いるオリゴDNAの設計・作製を行なった。当該ターゲット配列としては、ラットp27^{Kip1}cDNAのヌクレオチド番号830~847(5'-GGCAGAAG ATTCTTCTTC-3'; 配列番号7)、532~550(5'-AGCGCAAGTGAATTTTCGA-3'; 配列番号8)、372~390(5'-GTGAGAGTGCTAACGGGA-3'; 配列番号9)の3種を採用した。以下、配列番号7~9に基づくsiRNAを#1、#4、#6とする。配列番号7~9に基づくsiRNA-#1、#4、#6を発現するベクターを構築する際に用いた挿入オリゴDNA配列は以下の通りである。

【0111】

siRNA-#1: 5'-CACCGTAGG AGGTTCTTCT TCAACGTGTG CTGTCCGTTG AAGAAGAATC TTCTGCCTTT TT-3' (配列番号10) 及び、5'-GCATAAAAG GCAGAAGATT CTCTTCAAC GGACAGCACA CGTTG AAGAA GAACCTCCTA CC-3' (配列番号11)。

【0112】

siRNA-#4: 5'-CACCAAGTGA AGTGGAGTTT CGAACGTGTG CTGTCCGTTG GAAATTCCAC TTGCGCTTTT TT-3' (配列番号12) 及び、5'-GCATAAAAAA GCGCAAGTGG AATTTTCGAAC GGACAGCACA CGTTC GAAAC TCCACTTACA CT-3' (配列番号13)。

【0113】

siRNA-#6: 5'-CACCGTGGGA GTGTTTAATG GGAACGTGTG CTGTCCGTTG CCGTTAGACA CTCTCACTTT TT-3' (配列番号14) 及び、5'-GCATAAAAG TGAGAGTGTG TAACGGGAAC GGACAGCACA CGTTC CCATT AAACACTCCC AC-3' (配列番号15)。

【0114】

上記の3組のsiRNAターゲット配列を含むオリゴDNAをアニーリングさせた後、RNA発現用ベクター(pcPURU6 β icassette、iGENE社)のBsmMI部位に挿入した。このベクターはヒトU6プロモーターの制御下で挿入遺伝子に相当するRNAの転写が開始する構築になっており

、哺乳動物の細胞内で目的のRNAを高発現させることが可能である。次に、当該ベクターをEcoRI及びHindIIIで切断して、U6プロモーター及び挿入遺伝子配列を含む断片を精製し、その末端をT4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑化した後、コスミドpAxcwit (TAKARA BIO社)のSwaI部位に挿入した。続いてこのコスミドと、ヒトアデノウイルス5型のゲノムDNAに由来する制限酵素処理済みDNA-TPCとをヒト胎児腎臓由来の293細胞へトランスフェクションさせることにより、p27^{Kip1} siRNAを発現する組換えアデノウイルス (Ad-p27 siRNA-#1、#4、#6) を作製した。引き続き、当該ウイルスベクターについて、実施例1と同様の方法により、高力価ウイルス液の回収を行った。

【0115】

まず、D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞に、上記p27 siRNAを共発現させ、p27^{Kip1} 蛋白の発現に及ぼす効果をウエスタンブロット法により検討した。即ち、心筋細胞にAd-D1NLS、Ad-CDK4、及びAd-p27 siRNA (それぞれmoi = 100) をトランスフェクションし、48時間培養した後、p27^{Kip1} 蛋白の発現をウエスタンブロット法にて解析した。心筋細胞の調製、核蛋白質の調製、ウエスタンブロット解析等の方法は、上記 (実施例1及び3) 記載の方法と同じである。

【0116】

結果を図9に示した。心筋細胞にD1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションすると、上述の実験 (図1、3、7) と同様、p27^{Kip1} 蛋白の発現が強く誘導された。その際、p27 siRNA (#1、#4、#6) を心筋細胞に発現させることにより、p27^{Kip1} 蛋白の産生は著しく減少し、特にp27 siRNA-#6ではp27^{Kip1} 蛋白の発現はほとんど認められなくなった。p27 siRNAの発現は、p27^{Kip1} 蛋白に対して特異的な抑制効果を示し、p21^{Cip1} 蛋白やサイクリンD1蛋白、サルゴメア・アクチンの細胞内含有量に影響を及ぼすことはなかった。また、免疫組織染色の結果においても、p27 siRNAの発現により、心筋細胞の核内のp27^{Kip1} 蛋白の集積がほとんど見られなくなった。

【0117】

引き続き、心筋細胞にAd-D1NLS、Ad-CDK4、並びにAd-p27 siRNA-#6 (それぞれmoi = 100) をトランスフェクションし、その後の細胞数を経時的に測定した。実施例4の結果と同様、D1NLS及びCDK4遺伝子を発現させた心筋細胞は、培養7日後にはその細胞数が約3倍に増加した (図10)。これに対し、D1NLS、CDK4、p27 siRNAの三者を発現させた心筋細胞では、細胞数が有意に増えることが確認できた。一方、陰性対照としてLacZ発現ウイルスを感染させた心筋細胞、並びにAd-p27 siRNAのみを感染させた心筋細胞ではほとんど細胞数の増加は認められなかった。以上の結果から、p27 siRNAの発現により、D1NLS+CDK4刺激により促進された心筋細胞の増殖能を、更に有意に促進し得ることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0118】

本発明の方法によれば、従来法よりも効率的に心筋細胞の細胞分裂を誘導し、細胞を増殖させることができ、この様にして作製した細胞は、各種薬剤のスクリーニング用及び移植治療用の細胞として利用することができる。また、本法を遺伝子治療に応用することにより、心筋細胞の欠失等に起因する、心疾患の再生医療的治療への利用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0119】

【図1】 D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞におけるp27^{Kip1} 蛋白の発現。核蛋白質を調製し、ウエスタンブロット法によりp27^{Kip1} 蛋白の発現を検討した。CM: 初代培養ラット心筋細胞、REF: ラット線維芽細胞株 (REF52細胞)

【図2】 D1NLS及びCDK4遺伝子をトランスフェクションした心筋細胞におけるp27^{Kip1} 蛋白の局在。LacZ遺伝子 (上段; Cont) 又はD1NLS遺伝子及びCDK4遺伝子 (下段) を含む組換えアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、免疫蛍光染色法によりp27^{Kip1} 蛋白の細胞内発現を検討した。図中、緑色はp27^{Kip1}、赤色はサルゴメア・アクチンを示す。また、細胞核をDAPIで染色した。

【図 3】心筋細胞における $p27^{Kip1}$ 蛋白の発現制御。FBS刺激又はD1NLS+CDK4刺激下の心筋細胞を、プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン (LC) で処理し、 $p27^{Kip1}$ 蛋白の発現を比較した。

【図 4】心筋細胞における $p27^{Kip1}$ 蛋白のユビキチン化。FBS刺激又はD1NLS+CDK4刺激下の心筋細胞 (CM) 又は線維芽細胞 (REF) の細胞抽出物を用いて *in vitro* ユビキチン化反応を行い、その後、ウエスタンブロット法により $p27^{Kip1}$ 蛋白を検出した。図中IBは、ウエスタンブロット解析に用いた抗体を示す。高い分子量の位置に認められるバンドが、ユビキチン化された $p27^{Kip1}$ 蛋白 ($p27$ -GST-Ub) である。

【図 5】心筋細胞における Skp2 蛋白の発現。FBS刺激又はD1NLS+CDK4刺激下の心筋細胞を、プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン (LC) で処理し、Skp2 蛋白の発現を比較した。

【図 6】Skp2 遺伝子の共発現による $p27^{Kip1}$ 蛋白の減少。D1NLS、CDK4、及びSkp2 遺伝子を心筋細胞にトランスフェクションし、 $p27^{Kip1}$ 蛋白の発現を検討した。

【図 7】D1NLS、CDK4並びにSkp2 遺伝子を共発現させた心筋細胞における $p27^{Kip1}$ 蛋白の局在。D1NLS+CDK4 遺伝子 (上段; Cont) 又はD1NLS+CDK4+Skp2 遺伝子 (中、下段) を含む組換えアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、一部はプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン (LC) で処理した後 (下段)、免疫蛍光染色法により $p27^{Kip1}$ 蛋白の細胞内発現を検討した。図中、緑色は $p27^{Kip1}$ 、赤色はサルコメア・アクチンを示す。また、細胞核をDAPIで染色した。

【図 8】Skp2 遺伝子の強制発現による心筋細胞の増殖促進効果。LacZ 遺伝子 (Cont)、D1NLS+CDK4 遺伝子、D1NLS+CDK4+Skp2 遺伝子、又はSkp2 遺伝子のみを含む組換えウイルスを心筋細胞に感染させ、経時的に心筋細胞の数を計測した。

【図 9】 $p27^{Kip1}$ 遺伝子特異的 siRNA の共発現による $p27^{Kip1}$ 蛋白の減少、D1NLS、CDK4 遺伝子及び $p27^{Kip1}$ 遺伝子特異的 siRNA を心筋細胞にトランスフェクションし、 $p27^{Kip1}$ 蛋白の発現を検討した。

【図 10】 $p27^{Kip1}$ 遺伝子特異的 siRNA の強制発現により心筋細胞の増殖促進効果。LacZ 遺伝子 (Cont)、D1NLS+CDK4 遺伝子、D1NLS+CDK4 遺伝子+ $p27^{Kip1}$ 遺伝子特異的 siRNA、又は $p27^{Kip1}$ 遺伝子特異的 siRNA のみを含む組換えウイルスを心筋細胞に感染させ、経時的に心筋細胞の数を計測した。

【符号の説明】

【0120】

+: FBSや薬剤を添加した、又は各種の組換えアデノウイルスを感染させたことを示す。
-: FBSや薬剤を添加せず、又は各種の組換えアデノウイルスを感染させなかったことを示す。

p27: $p27^{Kip1}$ 蛋白質を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi Suntory Pharma Co., Ltd.
Daiichi Suntory Biomedical Research Co., Ltd.

<120> Method for proliferating cardiomyocytes

<130> P7491GNNP

<150> JP P2003-391708

<151> 2003-11-21

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 1

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer of C-terminal cyclin D1

<400> 2

accctccatg gtagctgctg gga

23

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' primer of C-terminal cyclin D1

<400> 3

tgatctcgag gtcgatgtcc acatctcgca cgt

33

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Flag tag sequence

<400> 4

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 5
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' primer of Skp2 cDNA

<400> 5
atactcgagg ccaccatgga ctacaaggac gacgatgaca agcataggaa gcaccttcag 60
gagatt 66

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' primer of Skp2 cDNA

<400> 6
atactcgagt catagacaac tgggcttttg cag 33

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rat p27/Kip1 siRNA target sequence 1

<400> 7

ggcagaagat tcttcttc

18

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Rat p27/Kip1 siRNA target sequence 2

<400> 8

agcgcaagtg gaatttcga

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Rat p27/Kip1 siRNA target sequence 3

<400> 9

gtgagagtgt ctaacggga

19

<210> 10

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 1 for p27 siRNA-#1 expression

<400> 10

caccggtagg aggttcttct tcaacgtgtg ctgtccgttg aagaagaatc ttctgccttt 60

tt

62

<210> 11

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 2 for p27 siRNA-#1 expression

<400> 11
gcataaaaag gcagaagatt ctcttcaac ggacagcaca cgttgaagaa gaacctccta 60
cc 62

<210> 12
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligo 1 for p27 siRNA #4 expression

<400> 12
caccagtgtg agtggagttt cgaacgtgtg ctgtccgttc gaaattccac ttgcgctttt 60
tt 62

<210> 13
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligo 2 for p27 siRNA #4 expression


<400> 13
gcataaaaaa gcgcaagtgg aatttcgaac ggacagcaca cgttcgaaac tccacttaca 60
ct 62

<210> 14
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligo 1 for p27 siRNA #6 expression

<400> 14
caccgtggga gtgtttaatg ggaacgtgtg ctgtccgttc ccgttagaca ctctcacttt 60
tt 62

<210> 15
<211> 62



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 2 for p27 siRNA #6 expression

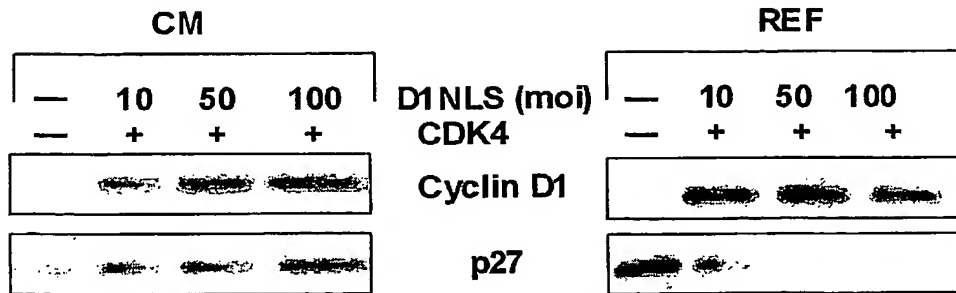
<400> 15

gcataaaaag tgagagtgtc taacgggaac ggacagcaca cgttcccatt aaacactccc 60

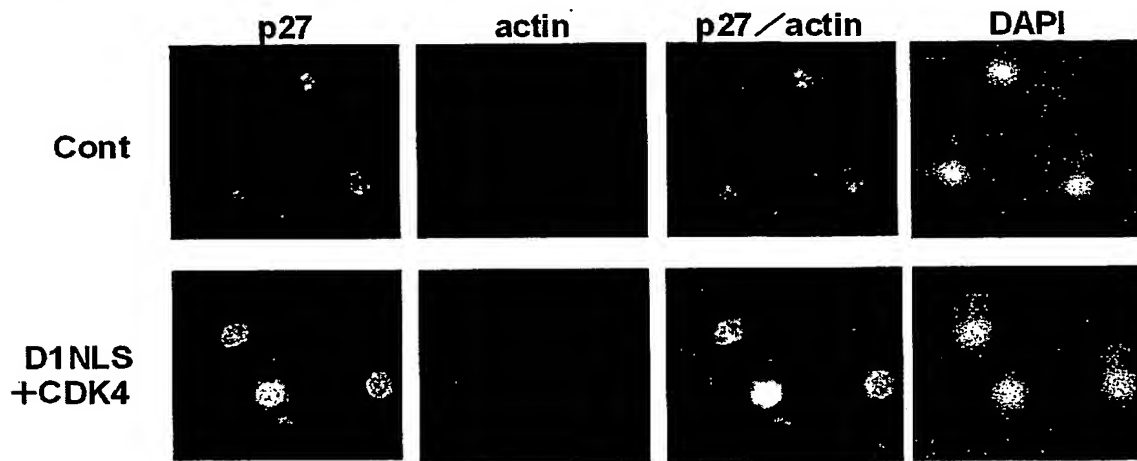
ac 62

【書類名】 図面

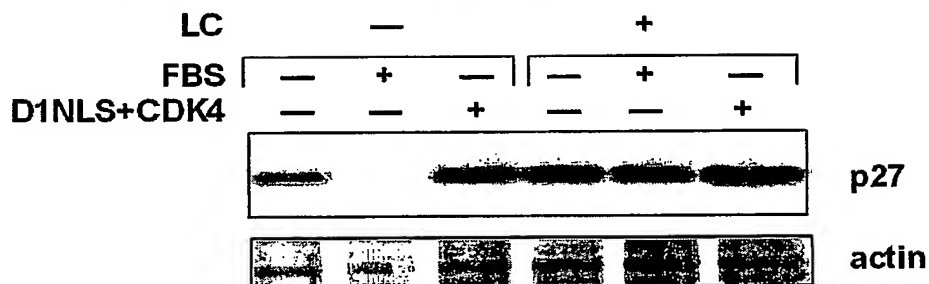
【図 1】



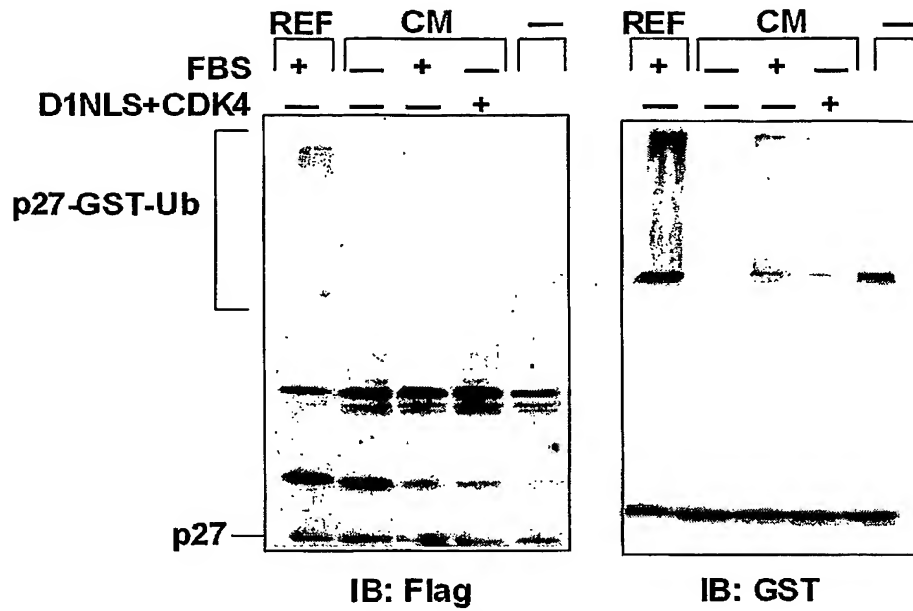
【図 2】



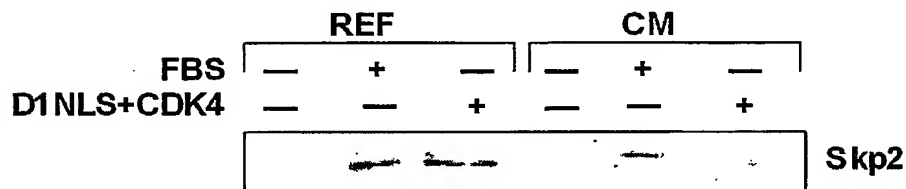
【図 3】



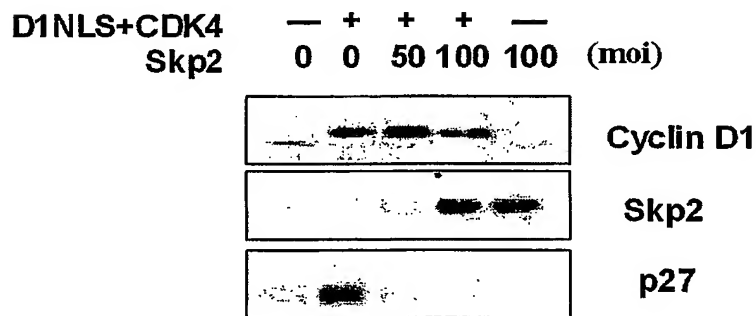
【図 4】



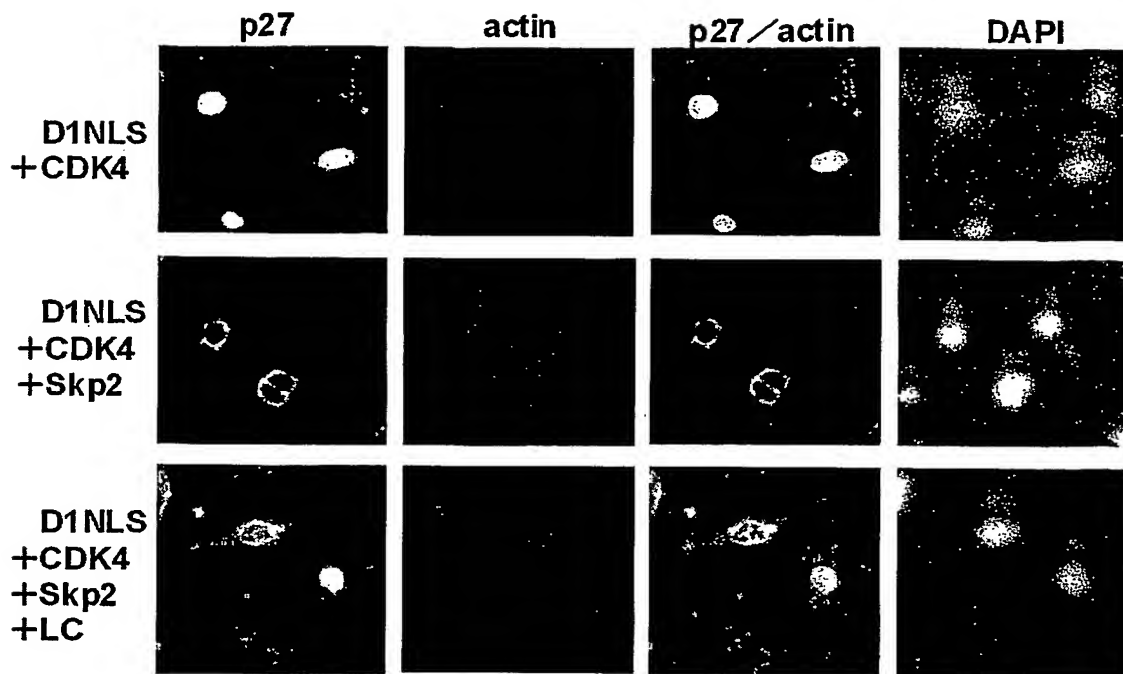
【図 5】



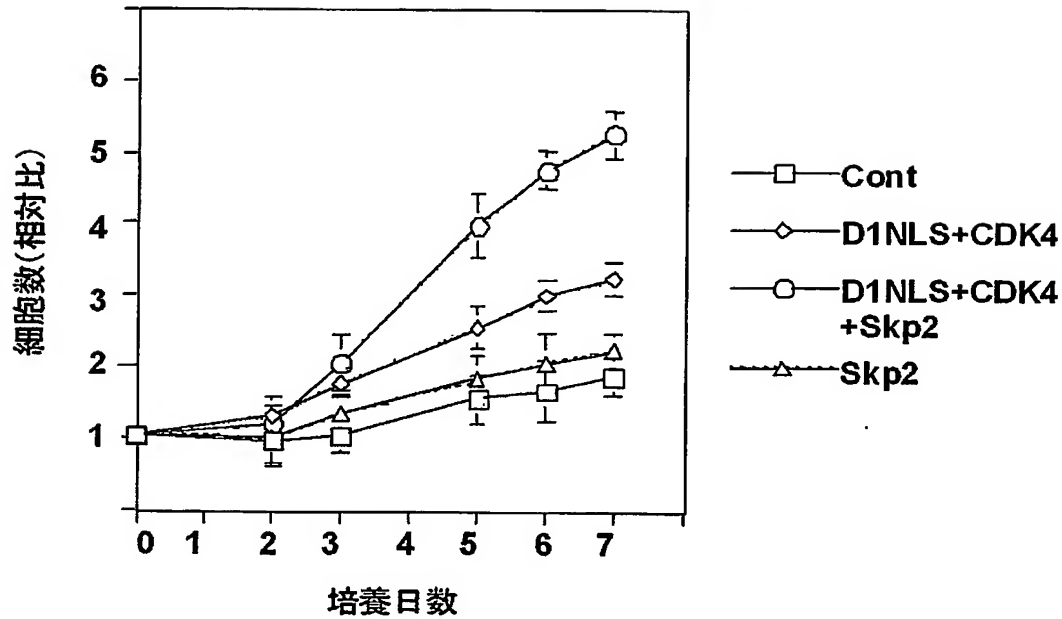
【図 6】



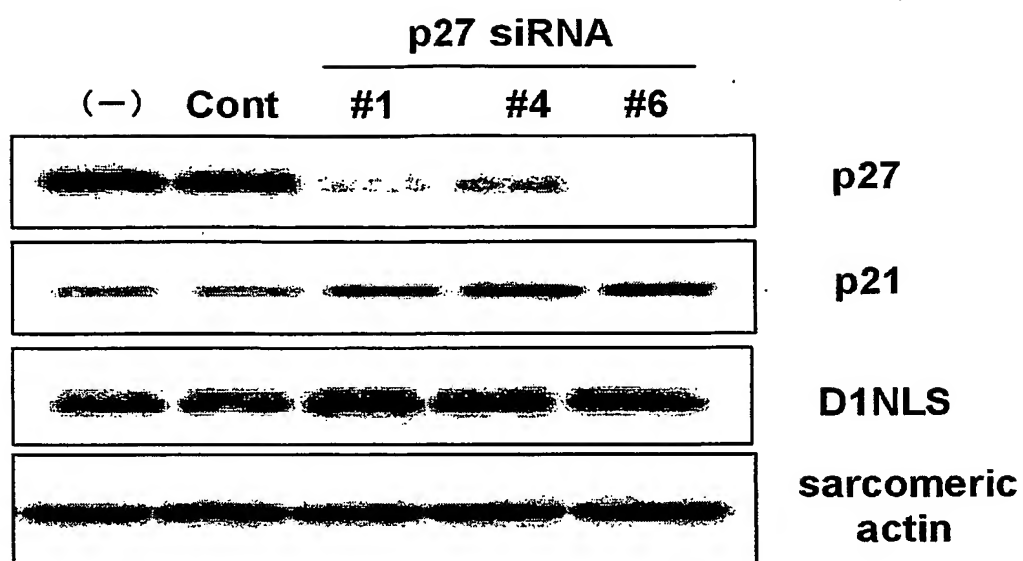
【図 7】



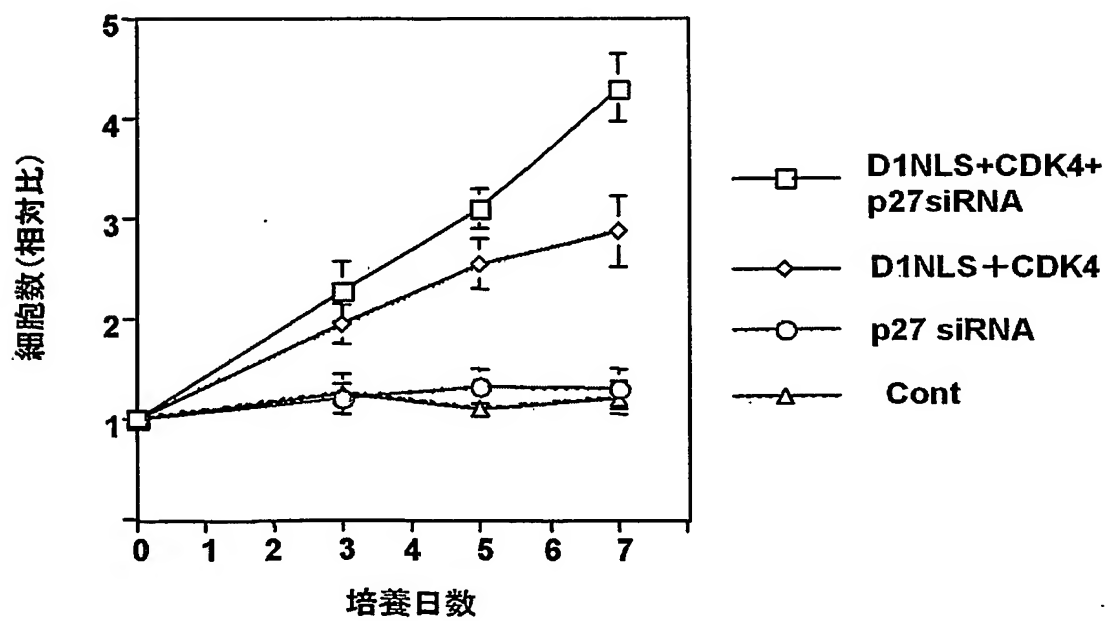
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

心筋細胞の増殖を誘導し、増殖効率を高める。

【解決手段】

心筋細胞にサイクリン及びCDKを発現させ、並びにCip/Kip蛋白の作用を抑制するか、又はCip/Kip蛋白の産生を阻害する。Cip/Kipファミリー蛋白としては、 $p27^{Kip1}$ の作用を抑制し、又はその産生を阻害することが好ましい。本発明の実施に用いる組換えベクターとして、(1)サイクリン遺伝子、(2)サイクリン依存性キナーゼ遺伝子、並びに(3)Cip/Kip蛋白の作用を阻害する因子をコードする遺伝子及びCip/Kipファミリー蛋白の産生を阻害する核酸配列からなる群から選択される1つ又はその複数を含有するベクターが提供される。

【選択図】

図10

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-246533
受付番号	50401439747
書類名	特許願
担当官	楠本 眞 2169
作成日	平成16年10月21日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	503062312
【住所又は居所】	東京都千代田区麹町五丁目7番地2
【氏名又は名称】	第一サントリーファーマ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	500422182
【住所又は居所】	大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
【氏名又は名称】	株式会社第一サントリー生物医学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】	100080816
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7階加藤内外特許事務所
【氏名又は名称】	加藤 朝道

特願 2 0 0 4 - 2 4 6 5 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 0 6 2 3 1 2]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 2 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区麴町五丁目 7 番地 2
氏 名	第一サントリーファーマ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 4 2 2 1 8 2]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 3 月 1 7 日
[変更理由]	名称変更
住 所	大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号
氏 名	株式会社第一サントリー生物医学研究所